

Mobility Shift Affinitätskapillarelektrophorese

-

Eine schnelle und präzise Methode zur Überprüfung von Liganden-Einflüssen auf Proteine

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sabine Redweik
aus Sögel

1. Referent: Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick
eingereicht am: 01.07.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am: 01.11.2013

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H., Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 1: Performance. *Electrophoresis* 33 (22): 3316-3322 (2012).

Redweik, S., Cianciulli, C., Hara, M., Xu, Y., Wätzig, H., Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 2: Cations. *Electrophoresis* 34 (12): 1812-1819 (2013).

Tagungsbeiträge

Redweik, S., Deng, X., Wätzig, H.: Influences on protein properties. (Poster) 25th International Symposium on Microscale BioSeparations, Prag (2010).

Redweik, S., Deng, X., Wätzig, H.: A study of influences on protein properties using Affinity Capillary Electrophoresis. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Braunschweig (2010).

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H.: How Proteins interact with close Ions in the surrounding solution. (Poster) Proteomic Forum, Berlin (2011).

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H.: Protein-Ion Interactions detected by Affinity Capillary Electrophoresis. (Poster) 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest (2011).

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H.: Protein interaction with ions in their surrounding solution detected by Affinity Capillary Electrophoresis. (Poster) Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies, Innsbruck (2011).

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H.: Protein interactions with their surrounding anions and cations precisely detected by Affinity Capillary Electrophoresis. (Vortrag) Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies, Innsbruck (2011).

Redweik, S., Xu, Y., Wätzig, H.: Proteins and their surrounding solution: interactions with ions detected by Affinity Capillary Electrophoresis. (Vortrag) 27th International Symposium on Microscale BioSeparations and Analyses, Genf (2012)

Redweik, S., Wätzig, H.: Diversified influences of arginine and guanidine on proteins. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Greifswald (2012)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig angefertigt.

Lieber Hermann, ich danke dir für die Gelegenheit in deinem Arbeitskreis promovieren zu dürfen. Danke für dieses außerordentlich spannende Thema und die guten Diskussionen und Möglichkeiten, die du mir geboten hast.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich bei Prof. Dr. Conrad Kunick bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Lukas Kaminski, durch den alles mehr oder weniger angefangen hat, sowie Claudia Cianciulli, Daphny Kaminski und Sandra Grotefend für viel Aufmunterung, hilfreiche Diskussionen und reichlich Frohsinn. Natürlich danke ich auch meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen im Arbeitskreis Dr. Lukas Kaminski, Dr. Xi Deng, Sascha Kühne, Claudia Cianciulli, Sandra Grotefend, Tobias Rakow, Elif Topbaş, Eva Benend, Hassan Alhazmi und Markus Nachbar, sowie Dr. Yuanhong Xu.

Hierbei ist ein Dank an die restliche „Neubau-Kaffeerunde“ natürlich nicht zu vernachlässigen: Dr. Hans-Otto Burmeister, Daphny Kaminski, Petra Reich, Dr. Stephanie Ludewig und Janina Nolte. Für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit im Rahmen ihres Wahlpflichtfaches danke ich Esen Baş und Oliver Orban.

Vielen Dank auch an Dr. Lutz Preu, der nicht nur bemerkenswert Korrektur gelesen hat, sondern auch immer ein guter Mentor und Ansprechpartner war. Des Weiteren ein großer Dank an die ehemaligen und aktuellen Assistenten vom achten Semester Dr. Stefanie Schmidt, Dr. Jasmin Ryczak, Dr. Florian Kölling, Julia Schur, Anne Walter und Hoang Lande, sowie Margrit Isedor, Sybille Lucka und natürlich Frank Roesse für die Unterstützung im Praktikumsablauf.

Ein Dank auch an alle hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter der Medizinischen und Pharmazeutischen Chemie für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Ralf Möller für immer wieder spannende Diskussionen und das Korrekturlesen.

Für die Bereitstellung der ERK1-Peptidsegmente möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturanalyse“ unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf Dieter Lehmann vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Einen riesigen Dank richte ich an Christoph Schönherr für die jahrelange Unterstützung im Studium und der Promotion. Es ist wahnsinnig wie viel Geduld und guten Zuspruch du mir gewährt hast. Ein großes Dankeschön auch an Friederike Würch, die immer für mich da war und folgenden Spruch mit mir teilt: „Freunde sind wie Kinder. Man findet nicht immer alles gut was sie machen, aber man hält zu ihnen.“ Und natürlich danke ich auch meiner Familie, meinen Eltern Christine und Jürgen Redweik, sowie meinen Geschwistern Karin und Richard, für den Beistand und den Glauben an mich.

„Die Schönheit der Chance, dass wir unser Leben lieben so spät es auch ist.
Das ist nicht die Sonne, die untergeht, sondern die Erde, die sich dreht.“
(Thees Uhlmann)

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iii
Abkürzungsverzeichnis und Symbole	1
Abkürzungen	1
Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren	2
Symbole	3
1 Einleitung und Aufgabenstellung	5
2 Proteine	6
2.1 Allgemeiner Aufbau von Proteinen	6
2.2 Beeinflussung der Proteine	9
2.2.1 pH-Wert	9
2.2.2 Ionenstärke	9
2.2.3 Aminosäuren, Ionen und andere Zusätze	9
2.2.4 Posttranslationale Modifikationen	10
2.3 Denaturierung von Proteinen	10
2.4 Untersuchte Proteine	11
2.4.1 BSA	11
2.4.2 β -Lactoglobulin	12
2.4.3 Myoglobin	13
2.4.4 Ovalbumin	13
2.4.5 Extrazellulär signal-regulierten Kinasen	15
3 Kapillarelektrophorese	16
3.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese	16
3.1.1 Geräteaufbau	17
3.1.2 Kapillaren	19
3.1.3 Detektion	19
3.1.4 Elektrophoretische Mobilität	20
3.1.5 Elektroosmotischer Fluss	22
3.1.6 Effektive elektrophoretische Mobilität	25
4 Affinitätskapillarelektrophorese	26
4.1 Methoden der Affinitätskapillarelektrophorese	26
4.1.1 <i>Mobility Shift</i> Affinitätskapillarelektrophorese	26
4.1.2 Hummel-Dreyer Affinitätskapillarelektrophorese	27
4.1.3 <i>Frontal Analysis</i> Affinitätskapillarelektrophorese	28
4.1.4 <i>Vacancy Peak</i> Affinitätskapillarelektrophorese	29

4.1.5 Vacancy Affinitätskapillarelektrophorese	29
4.1.3 Gründe zur Auswahl der <i>Mobility Shift</i> Affinitätskapillarelektrophorese	30
4.2 Durchführung der <i>Mobility Shift</i> Affinitätskapillarelektrophorese	31
4.2.1 EOF-Marker	31
4.2.2 Mobilitätsquotienten	32
4.2.3 Bindungskonstanten	32
4.2.4 Konfidenzintervalle	35
4.3 Andere Methoden zur Affinitätsbestimmung	38
5 Metallionen	40
5.1 Getestete Metallionen	43
5.2 Interaktionen mit BSA	43
5.3 Interaktionen mit β -Lactoglobulin	45
5.4 Interaktionen mit Ovalbumin	46
5.5 Präzision der Mobilitätsquotienten	49
5.6 Zusammenfassung	50
6 Kationische Arzneistoffe	52
6.1 Getestete Arzneistoffe	52
6.2 Interaktionen mit BSA	53
6.3 Interaktionen mit β -Lactoglobulin	54
6.4 Interaktionen mit Ovalbumin	56
6.5 Präzision der Mobilitätsquotienten	58
6.6 Zusammenfassung	58
7 Anionen	60
7.1 Getestete Anionen	60
7.2 Besonderheit von Phosphationen	60
7.3 Interaktionen mit BSA	60
7.4 Interaktionen mit β -Lactoglobulin	61
7.5 Interaktionen mit Myoglobin	62
7.6 Interaktionen mit Ovalbumin	63
7.7 Präzision der Mobilitätsquotienten	64
7.8 Zusammenfassung	66
8 Arginin und Guanidin	68
8.1 Interaktionen mit BSA	68
8.2 Interaktionen mit β -Lactoglobulin	70
8.3 Präzision der Mobilitätsquotienten	72
8.4 Zusammenfassung	73

9 Einfluss von Phosphorylierungen auf Metallionen-Interaktionen	74
9.1 Getestete Metallionen	74
9.2 Extrazellulär signal-regulierten Kinase 1 - Peptidsegment	74
9.2.1 Ermittlung der notwendigen Peptidkonzentration	74
9.2.2 Interaktionen mit ERK1-Peptiden	76
9.2.3 Präzision der Mobilitätsquotienten	78
10 Zusammenfassung	79
11 Experimenteller Teil	82
11.1 Instrumentierung und Software	82
11.2 Kapillaren	82
11.3 verwendete Methode	83
11.4 Reagenzien und Chemikalien	84
11.4.1 Synthetisches ERK1-Peptid-Paar	85
11.5 Lösungen und Puffer	86
11.5.1 EOF-Marker Lösung	86
11.5.2 Proteinlösungen	86
11.5.3 Ligandenlösungen	86
11.5.4 Phosphatpuffer	87
11.5.5 Tris-Puffer	87
13 Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

Abkürzungen

A	Analyt
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Mobility Shift</i> Affinitätskapillarelektrophorese
AL	Analyt-Ligand-Komplex
BGE	Hintergrundelektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
β-LG	β-Lactoglobulin
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CGE	Kapillargelelektrophorese (<i>capillary gel electrophoresis</i>)
CIEF	Kapillarisoelektrische Fokussierung (<i>capillary isoelectric focusing</i>)
CMC	kritische Mizellare Konzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CZE	Kapillarzonenlektrophorese (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ERK	extrazellulär signal-regulierten Kinasen
evtl.	eventuell
FA	<i>Frontal Analysis</i> Affinitätskapillarelektrophorese
HSA	Humanes Serumalbumin
HD	Hummel-Dreyer Affinitätskapillarelektrophorese
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
ID	Innendurchmesser der Kapillare
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
ITP	Isotachophorese (<i>isotachophoresis</i>)
L	Ligand
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Kinase
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
NMR	Kernspinspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
PFG-NMR	gepulste Feldgradienten-Kernspinresonanzspektroskopie (<i>pulsed field gradient nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VACE	<i>Vacancy</i> Affinitätskapillarelektrophorese
vgl.	vergleiche
VP	<i>Vacancy Peak</i> Affinitätskapillarelektrophorese

Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren

Tabelle I-1: Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Pyrrolysin	Pyl	O
Selenocystein	Sec	U
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Symbole

$A(\lambda)$	Absorption bei der Wellenlänge λ
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
$cnf(\Delta)$	Konfidenzintervall einer Differenz
$cnf((R_i - R_f)/R_f)$	Konfidenzintervall der Differenz der Mobilitätsquotienten normiert auf R_f
c_A	molare Konzentration des freien Analyten $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_{AL}	molare Konzentration des Analyt-Ligand-Komplexes $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_i	molare Konzentration einer Probensubstanz i $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_L	molare Konzentration des freien Liganden $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
d	Schichtdicke der absorbierenden Lösung [cm]
Δ	Differenz
E	elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$
e_0	Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
ε	Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{\text{A} \cdot \text{s}}{\text{V} \cdot \text{m}}\right]$
$\varepsilon_{i,\lambda}$	molarer Absorptionskoeffizient eines Proteins i bei der Wellenlänge λ $\left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$
ε_λ	molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ $\left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$
F	Faraday-Konstante $\left[96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}\right]$
F_{el}	elektrische Kraft [N]
F_r	Reibungskraft [N]
f	Freiheitsgrad
f_i	Freiheitsgrad der Versuche mit Ligandenzusatz
f_f	Freiheitsgrad der Versuche ohne Ligandenzusatz
ΔG	freie Reaktionsenthalpie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$
ΔH	Reaktionsenthalpie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$
I	Lichtintensität des Probenstrahles $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$
I_0	Lichtintensität der eintretenden Strahlung $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$
IS	Ionenstärke $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
K	Gleichgewichtskonstante
K_a	Bindungskonstante $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
κ	Debye-Hückel-Parameter [m^{-1}]
L_{eff}	effektive Kapillarlänge (Kapillarlänge bis zum Detektor) [m]
L_{ges}	Gesamtlänge der Kapillare [m]
n	Stichprobenumfang
n_1	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)
n_2	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)
n_e	injizierte Probenmenge [mol]
η	Viskosität der Elektrolytlösung [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]
Δp	Druckdifferenz [Pa]
R	allgemeine Gaskonstante $\left[8,3144621 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right]$
R_c	Mobilitätsquotient in einem vollständig gesättigten System

R_f	Mobilitätsquotient in purem Laufpuffer
R_i	Mobilitätsquotient in Gegenwart einer definierten Ligandenkonzentration
$\Delta R/R_f$	auf R_f normierte Differenz der Mobilitätsquotienten R_i und R_f
$RSD\%$	prozentuale relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)
r	Innenradius der Kapillare [m]
r_i	Stokes'scher Radius eines Ions i [m]
ΔS	Entropie $\left[\frac{J}{K}\right]$
σ	Ladungsdichte an der Kapillaroberfläche $\left[\frac{A \cdot s}{m^2}\right]$
$\hat{\sigma}_{pool}$	gepoolte Standardabweichung
$\hat{\sigma}_{pool(i)}^2$	gepoolte Varianz der Versuche mit Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_{pool(f)}^2$	gepoolte Varianz der Versuche ohne Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_{total}$	totale Standardabweichung
$\hat{\sigma}_x$	Standardabweichung der Stichproben einer Grundgesamtheit x
$\hat{\sigma}_i^2$	Varianz der Versuche mit Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_f^2$	Varianz der Versuche ohne Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_{pool}^2$	gepoolte Varianz
$\hat{\sigma}_{total}^2$	totale Varianz
$\hat{\sigma}_x^2$	Varianz der Stichproben einer Grundgesamtheit x
T	absolute Temperatur [K]
t	Injektionszeit [s]
$t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$	Student-t-Verteilung mit einem zweiseitigen Vertrauensbereich
t_m	Migrationszeit [s]
U	Spannung [V]
U_i	Injektionsspannung [V]
μ_A	Mobilität des Analyten in freier Form $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{AL}	Mobilität des Analyt-Ligand-Komplexes in einem vollständig gesättigten System $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_e	Mobilität der Probenionen $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{eff}	effektive elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
$\mu_{ep,A}$	erscheinende elektrophoretische Mobilität des Analyten in Gegenwart einer definierten Ligandenkonzentration $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{ex}	experimentelle elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{EOF}	Mobilität des EOFs $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{ep}	absolute elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
V_e	Injektionsvolumen der elektrokinetischen Injektion [m ³]
V_h	Injektionsvolumen der hydrodynamischen Injektion [m ³]
v_{ep}	Wanderungsgeschwindigkeit des Ions i $\left[\frac{m}{s}\right]$
v_{EOF}	Geschwindigkeit des EOFs $\left[\frac{cm}{s}\right]$
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
x_i	Einzelmesswerte
z_i	Anzahl der Ladung pro Teilchen i
ζ	Zeta-Potential [V]

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die zunehmende Bedeutung von Proteinen durch ihren vermehrten Einsatz für diagnostische und therapeutische Zwecke bedingt die Notwendigkeit, Proteine und deren Eigenschaften genauer und umfassender zu charakterisieren. Ein wachsendes Forschungsgebiet beschäftigt sich mit der Suche und Charakterisierung von Proteinen zur präzisen Diagnose von Krankheiten, den sogenannten Biomarkern [1, 2]. Zur Diagnose von Krankheiten werden zwei verschiedene Veränderungen im Bezug auf Proteine näher erforscht. Zum einen werden Konzentrationsänderungen von bestimmten, mit der Krankheit in Verbindung stehenden, Proteinen bei einigen Erkrankungen beobachtet. Zum anderen zeigen sich bei einigen Erkrankungen Veränderungen von krankheitsrelevanten Proteinen. Vermehrt werden Proteine auch als Biopharmazeutika zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten verwendet. Nach Patentablauf der Biopharmazeutika werden häufig, vergleichbar zu den Generika, Biosimilars auf dem Arzneimittelmarkt eingeführt. Auf Grund von Abweichungen der Proteinstruktur ist eine große Debatte entfacht, die sich mit der Vergleichbarkeit und Austauschbarkeit dieser Biopharmazeutika beschäftigt [3–6]. Die physikochemischen Eigenschaften und physiologischen Wirkungen sind von der Herstellungsmethode, Reinigung und Formulierung abhängig [3, 6]. So zeigt zum Beispiel das Erythropoetin durch unterschiedliche Herstellungs- und Reinigungsmethoden eine Heterogenität mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, die auch zu verschiedenen biologischen Aktivitäten führen [3]. Aber nicht nur verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Eigenschaften der Biopharmazeutika, auch unterschiedliche Zusätze, die während des Herstellungsprozesses zum Beispiel zur Aufreinigung eingesetzt werden, können direkt oder indirekt, beispielsweise durch Denaturierung der Proteine, Einfluss nehmen [4]. Ein bedenkenloser Austausch von Biopharmazeutika ist dagegen innerhalb der sogenannten Bioidenticals möglich. Dies sind Biopharmazeutika, die aus derselben Produktionsstätte und folglich dergleichen Herstellung stammen, jedoch von unterschiedlichen Firmen vertrieben werden [7].

Wie die Diskussion um die Biopharmazeutika zeigt, lassen sich Proteine durch verschiedenste Faktoren beeinflussen. Zu diesen Einflussfaktoren, die nicht nur die Herstellung der Proteine betreffen, gehören unter anderem der pH-Wert, die Ionenstärke oder verschiedene Substanzen als Zusätze zu Arzneimittelformulierungen [8], die zu Aggregationen [8], Isoformen [9, 10] oder Denaturierungen [10] führen können. Eine Vorhersage der Wechselwirkungen ist kaum möglich, da viele Interaktionen Protein- und/oder Ligand-spezifisch sind [8]. Zum Nachweis dieser Interaktionen können verschiedene analytische Methoden, wie NMR (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*; Kernspinspektroskopie) [11, 12], Kristallstrukturanalyse [13], Affinitätschromatographie [14] oder isotherme Titrationskalorimetrie [15, 16], angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss auf Proteine mit Hilfe der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) ermittelt werden. Hierbei wird die Änderung der elektrophoretischen Mobilität der Proteine durch verschiedene Liganden in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration untersucht. Diese Methode stellt eine vergleichsweise schnelle und präzise Möglichkeit dar, den Einfluss der umgebenden Lösung auf ein Protein zu untersuchen. Der Einfluss von verschiedenen Liganden, wie Metallionen, Arzneistoffen und unterschiedlichen Anionen, auf Proteine wurde untersucht und ausgewertet. Ferner wurde der Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration untersucht und miteinander verglichen, sowie ein Einfluss von Phosphorylierungen von einem Peptid der Isoform 1 der extrazellulär signal-regulierten Kinasen (ERK1) auf die Metallionen-Interaktion untersucht.

2 Proteine

Proteine gewinnen aus medizinischer und pharmazeutischer Sicht immer mehr an Bedeutung. Veränderungen der Proteinstruktur können deren Funktion beeinflussen und verschiedene Krankheiten, wie Mukoviszidose [17], Phenylketonurie [18], Sichelzellanämie [19, 20], Alzheimer oder Parkinson [20, 21], verursachen. Zunehmend werden daher Proteine auch als Biomarker von Krankheiten eingesetzt. Hierzu werden entweder veränderte Konzentrationen von bestimmten, mit der Krankheit in Verbindung stehenden, Proteinen beobachtet oder Veränderungen von Proteinen mit spezifischen Antikörpern detektiert, wie zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis [22]. Des Weiteren werden vermehrt Biopharmazeutika zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten eingesetzt, wobei der wohl bekannteste Wirkstoff das Insulin zur Therapie des Diabetes ist. Daneben gibt es aber auch eine Reihe weiterer Krankheiten, die mit Biopharmazeutika behandelt werden, wie die rheumatoide Arthritis mit Infliximab oder Etanercept oder die multiple Sklerose mit β -Interferon.

Folglich wächst die Bedeutung, Systeme zur Proteincharakterisierung und Überwachung der Proteinstabilität zu etablieren und einzusetzen, um auch Bedenken bezüglich der Immunogenität auszuräumen [9]. Die Stabilität jedes Proteins ist unterschiedlich und kann auch je nach Betrachtung unterschiedlich definiert werden. So kann darunter zunächst die native Konformation eines Proteins verstanden werden, die es zu erhalten gilt [23]. In einem umfassenderen Sinn kann der Begriff der Proteinstabilität auch mögliche Wechselwirkungen des Proteins in einem bestimmten System umfassen. Diese Wechselwirkungen können zum Beispiel zu Aggregationen oder Abbaureaktionen führen, die dann eine stabile Proteinkonformation in einem spezifischen Produkt hervorbringen [4, 9, 14]. Eine genaue Charakterisierung von Proteinen und ihren Interaktionen zu verschiedenen Liganden, die sich in der Lösung, dem Packmittel, den Herstellungsanlagen, aber auch im menschlichen Körper zum Beispiel nach Applikation befinden können [9], ist daher von besonderem Interesse.

2.1 Allgemeiner Aufbau von Proteinen

Die Grundbausteine von Proteinen sind Aminosäuren. Seit langem sind 20 proteinogene Aminosäuren bekannt, die mindestens eine Carboxygruppe und vicinal dazu, also in α -Stellung, eine Aminogruppe aufweisen. Durch diese Struktur stellen Aminosäuren Ampholyte dar. Ist eine Aminosäure nach außen neutral, befindet sich diese an ihrem isoelektrischen Punkt, der dem pH-Wert der Elektroneutralität entspricht [24].

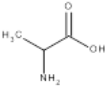
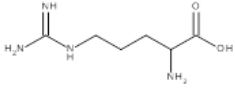
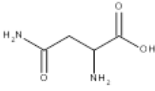
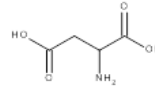
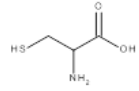
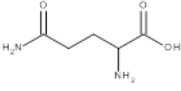
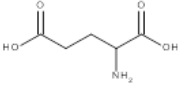

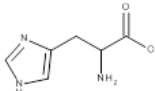
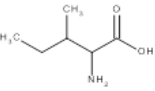
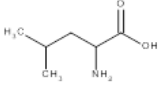
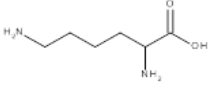
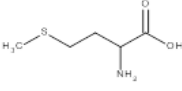
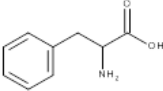
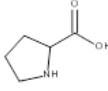
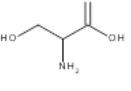
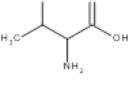
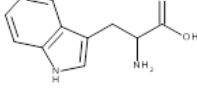
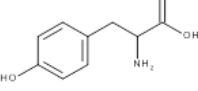
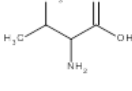
 <p>Alanin Ala A</p>	 <p>Arginin Arg R</p>	 <p>Asparagin Asn N</p>	 <p>Asparaginsäure Asp D</p>	 <p>Cystein Cys C</p>
 <p>Glutamin Gln Q</p>	 <p>Glutaminsäure Glu E</p>	 <p>Glycin Gly G</p>	 <p>Histidin His H</p>	 <p>Isoleucin Ile I</p>
 <p>Leucin Leu L</p>	 <p>Lysin Lys K</p>	 <p>Methionin Met M</p>	 <p>Phenylalanin Phe F</p>	 <p>Prolin Pro P</p>
 <p>Serin Ser S</p>	 <p>Threonin Thr T</p>	 <p>Tryptophan Trp W</p>	 <p>Tyrosin Tyr Y</p>	 <p>Valin Val V</p>

Abbildung 2-1: 20 proteinogene Aminosäuren mit Drei- und Einbuchstabencode

Vor einiger Zeit wurden zwei eher seltene proteinogene Aminosäuren, das Selenocystein und das Pyrrolysin entdeckt [25].

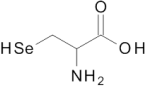
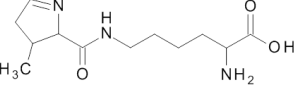
 <p>Selenocystein Sec U</p>	 <p>Pyrrolysin Pyl O</p>
---	--

Abbildung 2-2: 21. und 22. Aminosäure

Durch die Verknüpfung von Aminosäuren über Peptidbindungen -CO-NH-, also einer amidartigen Bindung zwischen der Carboxygruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure, entstehen Peptide. Diese werden entsprechend der Anzahl der Aminosäuren in Oligopeptide bis 10 Aminosäuren, Polypeptide bis ungefähr 100 Aminosäuren und darüber in Proteine gegliedert [24].

Der Aufbau von Proteinen kann in vier Bereiche gegliedert werden. So stellt die Aminosäuresequenz die Primärstruktur dar, die am N-Terminus beginnt und am C-Terminus endet. Diese Abfolge der Aminosäuren wird häufig mit dem Einbuchstabencode der Aminosäuren angegeben (siehe Abbildung 2-1 und 2-2, Tabelle I-1). Des Weiteren werden meist einzelne Aminosäuren, die unter einem bestimmten Aspekt betrachtet werden, wie zum Beispiel Bindungen zu Liganden, mit dem Dreibuchstabencode und der zugehörigen Positionsnummer der entsprechenden Aminosäure im Protein beschrieben (siehe zum Beispiel Abschnitt 2.4.4 Ovalbumin). Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen CO- und NH-Gruppen von Peptidbindungen werden verschiedene räumliche Strukturen ausgebildet. Diese Sekundärstrukturen zeigen meist die Struktur einer α -Helix oder eines β -Faltblattes. Eine α -Helix hat eine schraubenförmige Gestalt und ein β -Faltblatt parallel oder antiparallel zueinander verlaufende Peptidstränge [24]. In einer nächsten Anordnungsstufe wird die Tertiärstruktur durch Ausbildung verschiedener räumlicher Domänen mit den Sekundärstrukturen und den dazwischen befindlichen anderen Strukturelementen, meist Schleifen, geformt. An der Stabilisierung dieser Strukturelemente sind sowohl kovalente Wechselwirkungen durch Ausbildung von Disulfidbrücken und nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen, beteiligt. Die Darstellung von Tertiärstrukturen erfolgt mit Pfeilen für die β -Faltblätter, wobei die Spitze den C-Terminus bestimmt, mit Schrauben für α -Helices und Linien für ungeordnete Sekundärstrukturen (Abbildung 2-3). Mehrere zusammengesetzte Untereinheiten im beschriebenen Aufbau der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmen schließlich die Quartärstruktur von Proteinen [26].

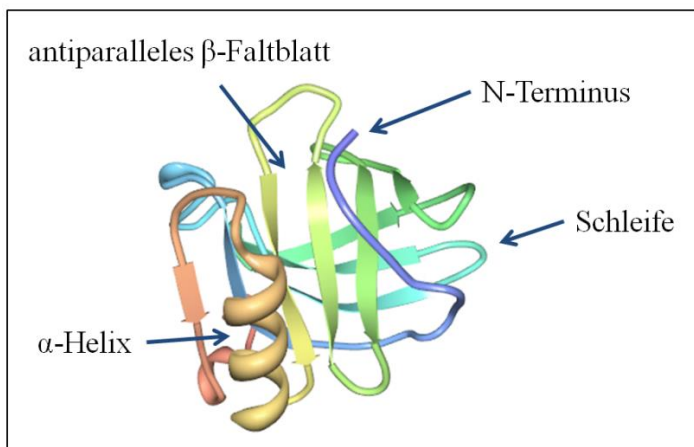


Abbildung 2-3: Proteinstruktur des β -Lactoglobulins (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 3BLG; [27]) mit Sekundärstrukturelementen

2.2 Beeinflussung der Proteine

Durch den konformativ beweglichen Strukturaufbau der Proteine, insbesondere der Tertiär- und Quartärstruktur, sind Proteine strukturell flexibel. Weitere Veränderungen von Proteinen zeigen sich in der Beeinflussung von verschiedensten Faktoren, von denen einige in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden. Durch die Beeinflussung der Proteine ergeben sich zum Teil Strukturveränderungen, wie Konformationsänderungen [9, 10], Aggregationen [8, 10], Denaturierungen (siehe Abschnitt 2.3) [10] und somit auch Veränderungen im physikochemischen Verhalten [28].

2.2.1 pH-Wert

Der pH-Wert nimmt großen Einfluss auf die Proteine. Einige Proteine zeigen bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Konformationen oder Aggregationen. Bei der Kontrolle von Proteinaggregationen stellt der pH-Wert der Proteinlösung den kritischsten Parameter dar, weil durch den pH-Wert sowohl die Gesamtladung des Proteins als auch die Verteilung der Oberflächenladung bestimmt wird. Durch diese Ladungsauswirkungen können sich somit intramolekulare Konformationsänderungen, aber auch intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen ergeben [8].

2.2.2 Ionenstärke

Auch die Ionenstärke hat einen großen Einfluss auf Proteine, ihre Größe und ihr Verhalten. So werden nicht nur Ladungsinteraktionen durch die Ionenstärke verändert, sondern zum Teil auch Konformationsänderungen beobachtet. Die Art der Ionen spielt dabei eine große Rolle (siehe Abschnitt 2.2.3) und viele Effekte, wie zum Beispiel die Proteinaggregation sind wiederum stark vom jeweiligen Protein abhängig [8].

2.2.3 Aminosäuren, Ionen und andere Zusätze

Proteine, insbesondere in Arzneimittelformulierungen, sind von verschiedenen und zahlreichen Substanzen, wie Aminosäuren, Salze oder Zucker, umgeben. Zum Teil sind diese Zusätze zur Stabilisierung von Biopharmazeutika notwendig [10] oder befinden sich im Primärpackmittel [29], wodurch diese in die Arzneimittelformulierung gelangen können. Nach Applikation im menschlichen Körper umgeben weitere Substanzen die eingesetzten Biopharmazeutika. Die Auswirkung dieser zahlreichen Substanzen auf die Proteine ist von besonderem Interesse und sehr mannigfaltig in ihrer Wirkung auf die Proteine [10]. Viele Hilfsstoffe in biopharmazeutischen Produkten sind zum Beispiel Zucker, Aminosäuren, Amine, Salze oder Polymere [10]. Zucker haben auf viele Proteine einen stabilisierenden und aggregationsverhindernden Effekt [30], können aber auch bei einigen Proteinen deren Abbau oder Aggregation hervorrufen [31]. Bei einigen Aminosäuren wurde zudem eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Proteinaggregation gefunden [8], so wurden Histidin und Glycin als sehr effektive Inhibitoren der Proteinaggregation beschrieben [8], aber auch als Aggregationsauslöser [32]. Der Einfluss der verschiedenen Zusätze kann je nach Protein unterschiedlich sein. Zudem zeigen die bereits oben beschriebenen Faktoren, wie der pH-Wert, einen zusätzlichen Einfluss auf den Effekt der Zusätze [33].

Die Auswirkung von Ionenzusätzen im Zusammenhang mit Proteinen wird häufig mit der sogenannten Hofmeister-Serie erklärt. Die Ionen sollen dabei Einfluss auf das umgebende Wasser haben und werden entweder in strukturbildende (kosmotrope) oder strukturbrechende (chaotrope) Ionen eingeteilt [34, 35]. Das Protein-umgebende Wasser hat abhängig von der Entfernung zum Protein unterschiedliche Eigenschaften. So kann eine Unterteilung in Bulkwasser und Hydrathülle vorgenommen werden [36]. Die Wasserhüllen werden nach Proteinnähe eingeteilt, so dass die erste Hydrathülle eine unmittelbare Proteinnähe aufweist. Das Wasser der Hydrathülle steht in direkter Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche und hält das Protein in Lösung. In einer Entfernung, die über die van-der-Waals-Kräfte hinausgeht, befindet sich das Bulkwasser, das somit nicht gebunden und beweglich ist [36]. Die aufgestellten Reihenfolgen für Anionen und Kationen der Hofmeister-Serie beschreiben die Zunahme der chaotropen Eigenschaften der jeweiligen Ionen. Diese strukturbrechenden Eigenschaften wurden als Zerstörung der Wasserstruktur durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen beschrieben, was zu einer Zunahme der Unordnung (Entropie) führt. Durch die strukturbrechende Wirkung werden hydrophobe Wechselwirkungen verhindert und somit Proteine in Lösung gehalten (Einsalzen von Proteinen) [37]. Die kosmotropen Salze dagegen stabilisieren die Wasserstruktur und führen somit bei steigender Salzkonzentration zu einer zunehmenden Verminderung der Hydrathülle der Proteine. Dadurch steigen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen an und es kommt zur Proteinaggregation (Aussalzen von Proteinen) [37].

Die 1888 aufgestellte Reihenfolge beschreibt eine stärkere Ausprägung bei Anionen [35] und wurde mit relativ hohen Ionenkonzentrationen von 0,1 bis 0,5 mol/l ermittelt, wobei in geringeren Konzentrationen eine veränderte Reihenfolge beschrieben wird [38]. Zudem sind auch bei Ioneneinflüssen Protein-abhängige Auswirkungen zu beobachten [38]. Einige Untersuchungen haben auch die Interaktion der Ionen mit dem umgebenden Wasser widerlegt [35] und postulieren eine direkte Ion-Protein-Interaktion oder einen Einfluss nur auf die erste Hydrathülle der Proteine [35, 39, 40].

2.2.4 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen erlauben Proteinen eine enorme Vielfalt an Modifikationen [28]. Diese Modifikationen, auch Isoformen genannt, sind sehr mannigfaltig. Es sind über 200 kovalente Modifikationen bekannt [41]. Die häufigsten Modifikationen sind Phosphorylierungen, Acylierungen, Glykosylierungen und Alkylierungen in unterschiedlichen Ausmaßen an verschiedensten Aminosäuren [41]. Durch diesen starken Variationsreichtum in der Proteinstruktur ergeben sich auch zahlreiche Änderungen der physikochemischen Eigenschaften der Proteine [28].

2.3 Denaturierung von Proteinen

Durch den bereits beschriebenen Aufbau der Proteine vor allem durch die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur (siehe Abschnitt 2.1) ergeben sich definierte räumliche und molekulare Strukturen. Diese sind für die biologische Aktivität von Proteinen verantwortlich [42]. Durch verschiedene Faktoren, wie Temperaturerhöhung, Säuren oder andere Reagenzien, wie Guanidinhydrochlorid, Harnstoff oder Detergenzien, können diese geordneten Strukturen zerstört werden. Durch diese Entfaltung verlieren Proteine ihre Aktivität [43]. Diese Denaturierung von Proteinen kann ein

irreversibler oder reversibler Zustand sein. Unter bestimmten Bedingungen, meist durch Entfernen des denaturierenden Faktors, kann eine Rückfaltung des Proteins, also eine Renaturierung, erfolgen [42].

2.4 Untersuchte Proteine

2.4.1 BSA

Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*; BSA) besteht aus 583 Aminosäuren. Die globuläre, also gefaltete und fast kugelförmige, Struktur des Proteins wird durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert [44], so dass von den vorliegenden 35 Cystein-Resten ein freies vorhanden ist [45]. Die Molekülmasse beträgt 66 kDa und BSA hat einen isoelektrischen Punkt von 4,9 [46].

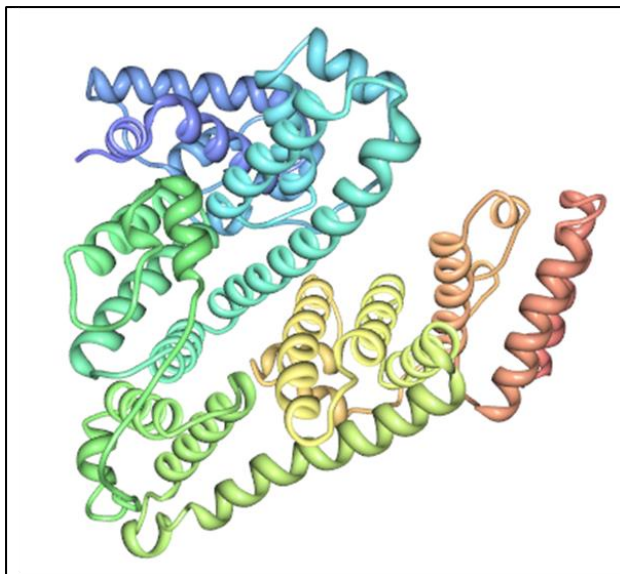


Abbildung 2-4: Rinderserumalbuminstruktur (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 3V03; [47])

Das BSA gehört, genauso wie das Humane Serumalbumin (HSA), zur Serumalbumin-Familie [48] und dient als ein wichtiges Transportprotein im Serum unter anderem für Fettsäuren, Kationen oder Steroide [44, 49]. Des Weiteren hat BSA eine Kupfer- und Nickel-Bindungsstelle, die auch ATCUN-Motiv genannt wird [50–52]. Diese Bindungsstelle wurde auch in anderen Proteinen entdeckt und muss neben einem freien N-Terminus auch ein Histidin in der dritten Position, sowie zwei interagierende Peptid-Stickstoffe aufweisen [50]. Zwei weitere Metall-Bindungsstellen werden diskutiert, die aber noch nicht genau identifiziert wurden [51, 52].

BSA zeigt geringe, pH-abhängige Konformationsänderungen [44]. Bei annähernd neutralem pH-Wert ist der Radius bestimmt mit gepulster Feldgradienten-NMR (*pulsed field gradient nuclear magnetic resonance spectroscopy*; PFG-NMR) am kleinsten. Bei geringeren pH-Werten formen sich dann reversible Dimere und bei höheren pH-Werten wird eine geringe Aufweitung des Proteins beschrieben [53]. Der BSA-Radius wird auch durch die Ionenstärke beeinflusst, wobei eine Erhöhung der Ionenstärke eine Vergrößerung des Radius bewirkt [54].

2.4.2 β -Lactoglobulin

β -Lactoglobulin (β -LG) weist verschiedene genetische Varianten auf. β -LG A und B sind die am häufigsten vorkommenden Varianten, die sich in zwei Aminosäuren unterscheiden. Aminosäure 64 ist bei Variante A Asparaginsäure und bei B Glycin und Aminosäure 110 Valin bei A und Alanin bei B [55]. Das Monomer besteht aus 162 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 18,35 kDA und einen isoelektrischen Punkt bei 5,1 [55]. β -LG hat ein freies Cystein und vier über Disulfidbrücken verknüpfte Cystein-Reste [55].

β -LG gehört zur Lipocalin-Familie und stellt durch die Ausbildung eines β -Faltblattes ein typisches Protein dieser Familie dar. Das β -Faltblatt besteht aus acht antiparallelen β -Strängen (A-H) [56].

Obwohl sehr viele Bindungsstudien mit β -LG durchgeführt wurden und auch sehr viele hydrophobe Moleküle als Liganden, wie zum Beispiel Vitamin A oder Fettsäuren, in vitro gefunden wurden, bleibt die Funktion bisher dennoch ungeklärt [56].

Eine Besonderheit bei β -LG sind die fünf pH-abhängigen Strukturübergänge. Bis zu einem pH-Wert von ungefähr 2,5 liegt β -LG hauptsächlich als Monomer vor, bei pH-Werten von 2,5 bis 4 als Dimer, bei pH 4,5 bis 6 findet ein Übergang in eine aufgeweitete Form als die native kompakte Form statt. Der Tanford-Übergang bei pH 7,5 [57] wird durch eine Verlagerung der EF-Schleife, dies betrifft die Aminosäuren 85 bis 90, bestimmt. Ab einem pH-Wert von 9 kommt es zu irreversiblen Entfaltungen des Proteins, die die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins betreffen [58].

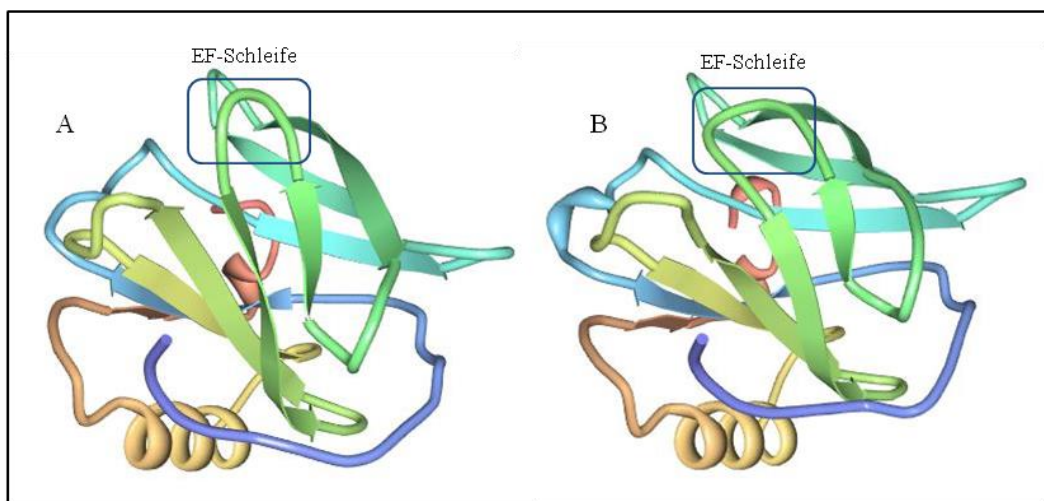


Abbildung 2-5: Konformationsänderung der EF-Schleife von β -LG bei verschiedenen pH-Werten.

A: offene Konformation bei pH 8,2 (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 2BLG; [27])

B: geschlossene Konformation bei pH 6,2 (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 3BLG; [27])

β -Lactoglobulin weist allerdings, ebenfalls wie BSA, nicht nur eine pH-abhängige Radiusveränderung auf, sondern auch eine Veränderung durch verschiedene Ionenstärken. Im Gegensatz zu BSA verringert sich der β -Lactoglobulin-Radius durch Erhöhung der Ionenstärke [59].

2.4.3 Myoglobin

Das aus 153 Aminosäuren bestehende Myoglobin hat eine Molekülmasse von 17,64 kDa [60] und einen isoelektrischen Punkt bei 7,2 [61].

Myoglobin gehört zur Familie der Hämproteine und weist somit eine Hämgruppe auf [62], wodurch Sauerstoff gebunden werden kann [63]. Das als prosthetische Gruppe, welche eine zur biologischen Aktivität benötigte kovalent gebundene organische Molekülstruktur darstellt, fungierende Häm besteht aus dem Protoporphyrin IX mit einem zentralen Eisenatom [63]. Ein Porphyrin ist ein zyklisch aufgebautes Molekül aus vier Pyrrolringen, die durch vier Methingruppen miteinander verbunden sind. Die vier Stickstoffatome der Pyrrolringe bilden zusammen mit dem Eisen eine Komplexverbindung. Die hydrophobe Bindetasche für das Häm wird von acht α -Helices ausgebildet [60, 63], die etwa 70 % des Proteins ausmachen [63]. Die sauerstofffreie Form des Myoglobins wird auch als Desoxymyoglobin bezeichnet und Oxymyoglobin beschreibt das mit Sauerstoff gebundene Myoglobin [63].

Myoglobin war das erste Protein, dessen dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde [62, 63].

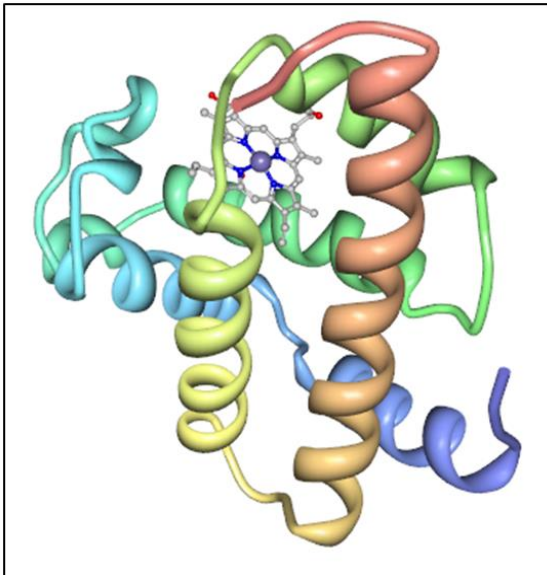


Abbildung 2-6: Myoglobinstruktur inklusive der Hämgruppe (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 1MBN; [64])

2.4.4 Ovalbumin

Ovalbumin ist das am häufigsten vorkommende Protein im Hühnereiweiß [65]. Es besteht aus 386 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 45 kDa [65]. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,5 [66]. Obwohl Ovalbumin sechs Cystein-Reste hat, sind nur Cys74 und Cys121 mit einer Disulfidbrücke verbunden [65].

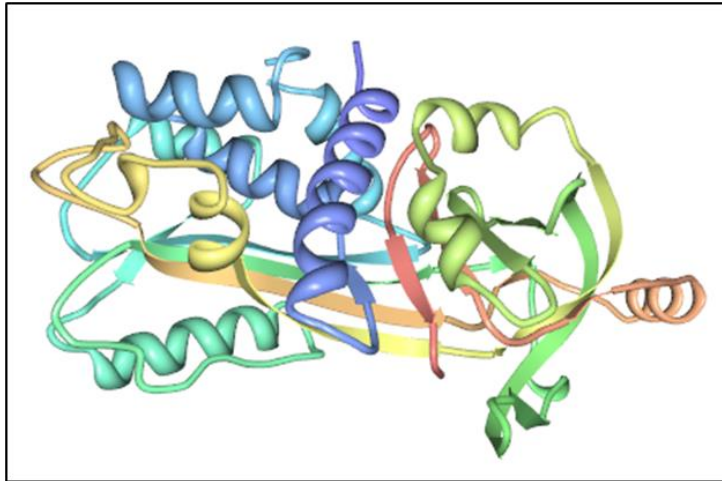


Abbildung 2-7: Ovalbuminstruktur (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 1OVA; [67])

Ovalbumin weist einige posttranslationale Modifikationen auf. So ist der N-Terminus acetyliert, der Amid-Stickstoff von Asn293 kann glykolisiert vorliegen und verschiedene Serin-Reste werden phosphoryliert [65, 68]. Die am häufigsten nachgewiesenen phosphorylierten Serin-Reste sind Ser69 und Ser345 [65, 68]. Heterogenität im elektrophoretischen Verhalten ist größtenteils auf die verschiedenen Phosphorylierungsgrade an diesen Seiten zurückzuführen [65]. Durch Größenausschlußchromatographie getrennte Hauptfraktionen wiesen zwei, eine oder keine Phosphatgruppe pro Ovalbumin in einem Verhältnis von 8:2:1 auf [65]. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls drei große Hauptfraktionen in der kapillarelektrophoretischen Trennung gefunden. Die drei erhaltenen Isoformen (siehe Abbildung 2-8) werden in den nachfolgenden Abbildungen durch verschiedene Blautöne gekennzeichnet.

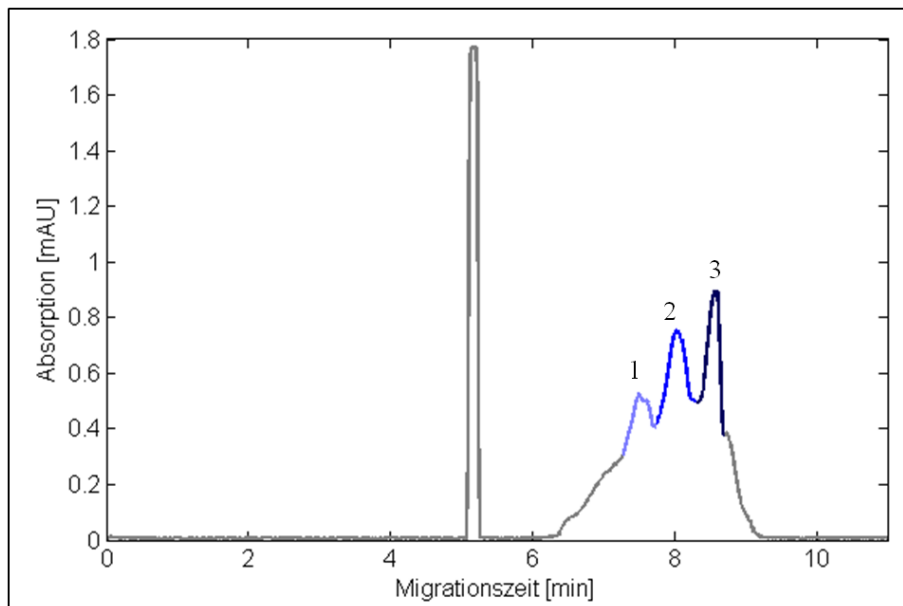


Abbildung 2-8: Elektropherogramm von Acetanilid und Ovalbumin. Die drei Hauptfraktionen der Ovalbumin-Isoformen sind mit verschiedenen Blautönen gekennzeichnet.

Die Funktion des zur Serpin-Familie [67] gehörenden Ovalbumins ist trotz seines Vorkommens von 60-65% des Proteins im Eiweiß ungeklärt [65].

Im Gegensatz zum BSA und β -LG wurde keine Radiusveränderung durch verschiedene Ionenstärken gefunden [69].

2.4.5 Extrazellulär signal-regulierten Kinasen

Es existieren mehrere Isoformen der extrazellulär signal-regulierten Kinasen (ERK) [70], die zu den Mitogen aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen) gehören [71]. Eine MAP-Kinase-Kaskade zeichnet sich dadurch aus, dass nachgeschaltet mehrere Kinasen, also phosphorylierende Enzyme, spezifisch die nachfolgende Kinase phosphorylieren und sich somit gegenseitig aktivieren [47]. Die zur MAP-Kinase-Familie gehörenden Proteine sind an verschiedensten Zellvorgängen beteiligt, wie an der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [70]. Die ERK-Signalkaskade ist allgegenwärtig und ihre Störung hat verschiedenste Auswirkungen. So wurde für ERK eine hohe Beteiligung bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen [47, 72], da dieses Enzym an der Expression von Onkogenen beteiligt ist [73, 74]. Bedingt durch die Omnipräsenz der ERK-Enzyme im Zellgeschehen ist ein Verständnis der ERK-Interaktionen nicht nur für die Entstehung sondern auch zur Behandlung von verschiedensten Krankheiten von Bedeutung [47].

Es gibt verschiedene Isoformen der ERK-Enzyme, von denen die ERK1- und ERK2-Isoformen am meisten untersucht sind [70]. Zur Aktivierung des Enzyms ist eine Doppelphosphorylierung an Thr202 und Tyr204 notwendig [71, 72], wobei teilweise auch Autophosphorylierungen gefunden werden [72].

3 Kapillarelektrophorese

3.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Die zu den elektrophoretischen Trennverfahren zugehörige Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*; CE) beruht auf der Migration geladener Teilchen in einer Elektrolytlösung unter Einfluss eines elektrischen Feldes meist in Richtung Kathode [75]. Auf einem CE-Gerät können je nach Analysenzweck verschiedene kapillarelektrophoretische Trenntechniken angewendet werden.

In der ursprünglichen Trenntechnik, die häufig auch einfach als Kapillarelektrophorese bezeichnet wird, der Kapillarzonenlektrophorese (*capillary zone electrophoresis*; CZE), ist die Kapillare mit einem einheitlichen Hintergrundelektrolyten (*background electrolyte*; BGE) gefüllt. Die Analyten werden durch unterschiedliche Mobilitäten aufgrund verschiedener Ladungs-Masse-Verhältnisse getrennt. Durch die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses (EOF; siehe Abschnitt 3.1.5) wandern auch Anionen und neutrale Moleküle in Richtung Kathode, allerdings werden hierbei die neutralen Moleküle nicht aufgetrennt.

Dieses kann hingegen in der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (*micellar electrokinetic chromatography*; MEKC) erreicht werden. Hierbei werden der Elektrolytlösung Tenside oberhalb der Tensid-spezifischen kritischen mizellaren Konzentration (*critical micelle concentration*; CMC) zugegeben, so dass sich Mizellen ausbilden. Diese Mizellen, bei denen die hydrophilen Gruppen nach außen und die lipophilen Gruppen nach innen ausgerichtet sind, bilden eine pseudostationäre Phase aus [76]. Die Trennung der neutralen Moleküle erfolgt durch unterschiedliche Verteilung zwischen mizellarer und wässriger Phase.

Einen zusätzlichen Molekularsiebeffekt erhält man in der Kapillargelelektrophorese (*capillary gel electrophoresis*; CGE) durch die Verwendung eines polymeren Gels ähnlich zur Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) [77, 78].

Des Weiteren wird die Kapillarisoelektrische Fokussierung (*capillary isoelectric focusing*; CIEF) verwendet, bei der amphotere Moleküle entlang eines pH-Gradienten getrennt werden können. Die amphoteren Moleküle wandern hierbei bis zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, so dass diese Moleküle folglich eine Nettoladung von Null aufweisen und eine Trennung nach isoelektrischen Punkten der Moleküle erfolgt [79].

Eine weitere Technik der Kapillarelektrophorese, die nur Ionen einer Ladungsart trennt und meist zur Aufkonzentrierung von Proben eingesetzt wird, ist die Isotachophorese (*isotachophoresis*; ITP). Hierbei wird ein diskontinuierliches Elektrolytsystem bestehend aus Leitelektrolyten mit hoher Ionenbeweglichkeit und Folgeelektrolyten mit geringer Ionenbeweglichkeit eingesetzt [80, 81].

Die in der vorliegenden Arbeit besprochene Affinitätskapillarelektrophorese (*affinity capillary electrophoresis*) beruht in ihrem Grundprinzip auf der Kapillarzonenlektrophorese, die in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben wird.

Tabelle 3-1: Trennprinzipien in der Kapillarelektrophorese; modifiziert nach [82]

Trenntechnik	Trennung nach Unterschieden in	hauptsächliche Applikation
Kapillarzonenlektrophorese CZE	Mobilität (Ladung; Masse)	kleine Ionen, Peptide, Proteine
Mizellare Elektrokinetische Chromatographie MEKC	Polarität	neutrale Moleküle, Aminosäuren
Kapillargelelektrophorese CGE	Größe	Proteine, DNA
Kapillarisoelektrische Fokussierung CIEF	isoelektrischem Punkt (Ladung)	Proteine
Isotachophorese ITP	Mobilität (Ladung; Masse)	kleine Ionen, Proteine

3.1.1 Geräteaufbau

Die namensgebende Kapillare bildet den Mittelpunkt des CE-Gerätes. Der Großteil der Kapillare befindet sich bei den meisten CE-Geräten in einem thermostatisierten, abgeschlossenen Bereich des Instrumentes. Die beiden Enden der Kapillare tauchen zusammen mit je einer Platinelektrode in die mit dem Hintergrundelektrolyt befüllten Probengefäße (*Vials*) ein und schließen dadurch den Stromkreis. Diese *Vials* sind bei einigen Geräten nur auf der Einlass-Seite (*Inlet*) bei den meisten neueren CE-Geräten jedoch auch auf der Auslass-Seite (*Outlet*) automatisch wechselbar. Durch eine mit den Elektroden verbundene Hochspannungsquelle können die notwendigen Spannungen von -30 kV bis $+30$ kV oder Stromstärken von -200 μ A bis $+200$ μ A eingestellt werden, so dass sich im normalen (hier angewendeten) Modus die Anode ((+)-Pol) im *Inlet* und die Kathode ((-)-Pol) im *Outlet* befindet [83, 84]. Um die Analyten zu detektieren, wird meist eine *Online*-Detektion unter Verwendung von optischen Methoden durchgeführt. *Offline*-Detektionen mit einem Massenspektrometer gewinnen aber zunehmend an Bedeutung.

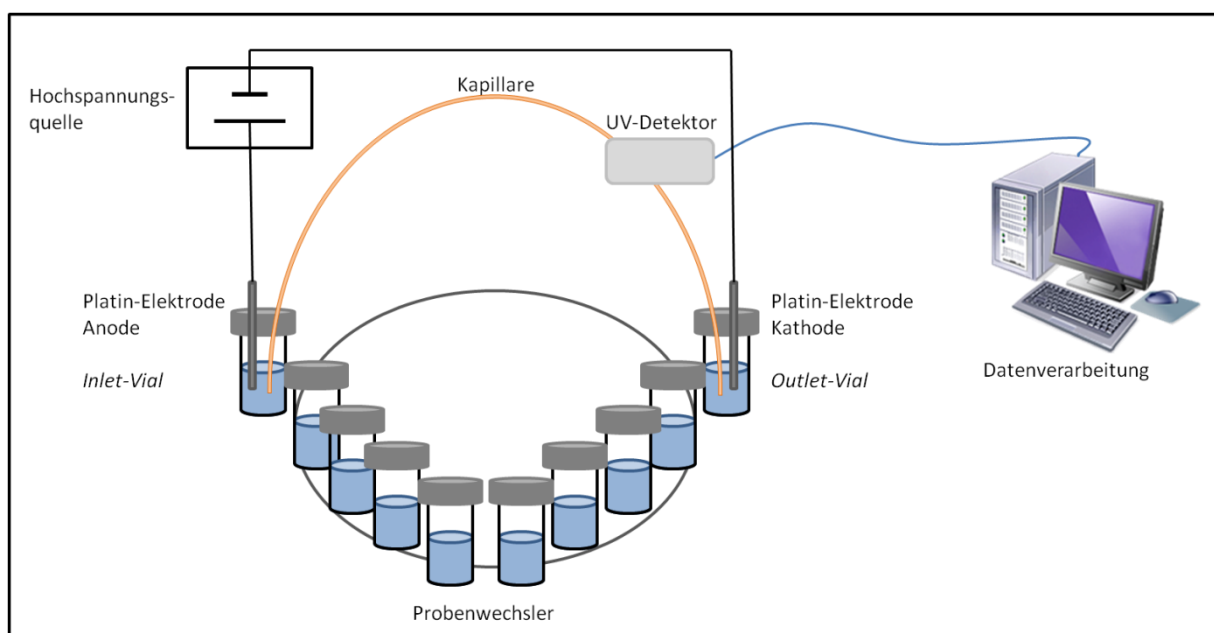


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung eines Kapillarelektrophorese-Gerätes mit normaler Polung (Kathode im *Outlet-Vial*)

Um die Kapillare zu spülen oder um eine Probe zu injizieren, ist jedes Kapillarelektrophoresegerät mit einem Drucksystem ausgestattet. Eine Probeninjektion durch entweder Unterdruck am *Outlet-Vial* oder, wie meist üblich, mit Überdruck am *Inlet-Vial* stellt die hydrodynamische Injektion dar. Das dabei injizierte Volumen V_h kann durch Verwendung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille errechnet werden, so dass folgende Formel eingesetzt werden kann [85]:

$$V_h = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L_{ges}} \quad (3-1)$$

V_h : Injektionsvolumen der hydrodynamischen Injektion [m³]
 Δp : Druckdifferenz [Pa]
 r : Innenradius der Kapillare [m]
 t : Injektionszeit [s]
 η : Viskosität der Elektrolytlösung [Pa·s]
 L_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare [m]

Neben der hydrodynamischen Injektion gibt es auch eine elektrokinetische Injektion, bei der die Probe durch Anlegen von Spannung injiziert wird. Hierbei sind das injizierte Volumen V_e und die injizierte Probenmenge n_e vom EOF (siehe Abschnitt 3.1.5) und der Mobilität der Probenionen (siehe Abschnitt 3.1.4) abhängig. Mit folgenden Formeln lassen sich das injizierte Probenvolumen V_e und die injizierte Probenmenge n_e errechnen [85]:

$$V_e = v_{EOF} \cdot \pi \cdot r^2 \cdot t \quad (3-2)$$

V_e : Injektionsvolumen der elektrokinetischen Injektion [m³]
 v_{EOF} : Geschwindigkeit des EOFs $\left[\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right]$
 r : Innenradius der Kapillare [m]
 t : Injektionszeit [s]

$$n_e = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot U_i \cdot c_i \cdot t}{L_{ges}} \quad (3-3)$$

n_e : injizierte Probenmenge [mol]
 μ_e : Mobilität der Probenionen $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}\right]$
 μ_{EOF} : Mobilität des EOFs $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}\right]$
 r : Innenradius der Kapillare [m]
 U_i : Injektionsspannung [V]
 c_i : molare Konzentration einer Probensubstanz i $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$

t : Injektionszeit [s]

L_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare [m]

3.1.2 Kapillaren

In der CE kommen verschiedene Kapillartypen zum Einsatz. Am häufigsten werden unbeschichtete Kapillaren aus Kieselglas (*bare fused-silica*) eingesetzt. Für einige Techniken und Methoden, wie die CIEF oder die DNA-Sequenzierung, werden jedoch auch beschichtete Kapillaren verwendet [79]. Hierbei gibt es zwei verschiedene Arten der Beschichtung. Zum einen findet die permanente Beschichtung Verwendung, die durch kovalente Bindung mit dem Kieselglas aufgebaut ist. Zum anderen werden dynamische Beschichtungen eingesetzt, die durch ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und anderen Mechanismen aufgebaut wurden [86, 87].

Durch die Verwendung von Kieselglas sind die Kapillaren gut für eine *Online*-UV-Detektion geeignet. Dafür muss allerdings die Polyimidbeschichtung, die auf der Außenseite der Kapillare zur Stabilisierung aufgebracht ist, entfernt werden [88, 89]. Das sogenannte Detektionsfenster gewinnt man durch Abbrennen der Polyimidbeschichtung und anschließendes Reinigen der Oberfläche von Rußpartikeln mit Aceton. An den Kapillarenden wird ebenfalls die Polyimidbeschichtung entfernt [89], um ein Verschleppen von Lösungen und deren Bestandteilen beim Wechseln der *Vials* zu reduzieren und die Präzision zu verbessern.

Die Kapillaren können verschiedene Innendurchmesser (ID) aufweisen, wobei Durchmesser von 25 bis 100 μm am gebräuchlichsten sind. Die eingesetzten Kapillarlängen hängen stark von dem verwendeten CE-Gerät und der durchzuführenden Analysenmethode und Probe ab. Hierbei wird unterschieden zwischen der Gesamtlänge der Kapillare L_{ges} und der effektiven Länge L_{eff} . Diese effektive Länge stellt dabei die Länge vom Beginn der Kapillare bis zum Detektionsfenster, also die bis zur Detektion zurückgelegte Trennlänge, dar.

Die Innenoberfläche der Kapillare muss vor dem ersten Gebrauch konditioniert und anschließend äquilibriert werden [88, 89]. Zur Konditionierung wird zumeist eine stark alkalische Lösung häufig mit erhöhter Temperatur durch die Kapillare gepumpt. In einem anschließenden Schritt erfolgt eine Äquilibration der Oberfläche durch Spülung der Kapillare mit dem Hintergrundelektrolyt. Dieses kann entweder durch Druck oder Anlegen einer Spannung erfolgen, um die Kapillarinnenoberfläche an den verwendeten BGE und dessen pH-Wert anzupassen. Durch diese Vorbereitung soll eine möglichst gleichmäßige Ladungsverteilung und dadurch bedingt ein konstanter EOF (siehe Abschnitt 3.1.5) über die gesamte Kapillarlänge erreicht werden.

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden ausschließlich unbeschichtete Kapillaren mit einem ID von 50 μm und einer totalen Kapillarlänge von 62 cm mit einer effektiven Kapillarlänge von 48 cm verwendet.

3.1.3 Detektion

Die gebräuchlichsten Detektoren messen die Absorption, wobei zumeist in älteren Geräten UV/VIS-Detektoren und bei neueren Geräten Dioden-Array-Detektoren (DAD) verbaut wurden. Ferner besteht die Möglichkeit Fluoreszenzdetektoren, Leitfähigkeitsdetektoren oder auch elektrochemische Detektoren zu verwenden. Die Kopplung mit einem Massenspektrometer gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Die am meisten verwendete Messung der Absorption stellt hohe Anforderungen an die optischen Systeme, da die Kapillare als Küvette fungiert. Durch den geringen Innendurchmesser der Kapillaren

ergibt sich somit auch eine geringe Schichtdicke d , die in das auch hier gültige Lambert-Beersche Gesetz einfließt [90]:

$$A(\lambda) = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c_i \cdot d \quad (3-4)$$

$A(\lambda)$: Absorption bei der Wellenlänge λ

I_0 : Lichtintensität der eintretenden Strahlung $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$

I : Lichtintensität des Probenstrahles $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$

ε_λ : molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ $\left[\frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$

c_i : molare Konzentration einer Probensubstanz i $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$

d : Schichtdicke der absorbierenden Lösung [cm]

Des Weiteren stellt die kreisförmige Gestalt der Kapillare eine Schwierigkeit in der Fokussierung dar. Um das monochromatische Licht auf das Kapillarlumen zu bündeln und den Streulichtanteil zu verringern werden fokussierende Linsensysteme benötigt und folglich die Empfindlichkeit erhöht [91].

3.1.4 Elektrophoretische Mobilität

In der Kapillarelektrophorese wird das Grundprinzip der Elektrophorese, also die Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld, ausgenutzt. Dadurch entsteht eine Migration der Ionen zu der entgegengesetzt geladenen Elektrode, so dass Anionen zur Anode und Kationen zur Kathode migrieren. In dem elektrischen Feld wirken zwei entgegengerichtete Kräfte auf die Teilchen, die elektrische Kraft F_{el} und die Reibungskraft F_r . Bei der Beschreibung der elektrischen Kraft F_{el} wird von einer unendlich verdünnten Lösung ausgegangen, in der keine ionischen Wechselwirkungen stattfinden.

$$F_{el} = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad (3-5)$$

F_{el} : elektrische Kraft [N]

z_i : Anzahl der Ladung pro Teilchen i

e_0 : Elementarladung $[1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}]$

E : elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$

Dieser Kraft entgegengesetzt ist die Reibungskraft F_r , die durch das Stokes'sche Gesetz beschrieben werden kann. Hierbei wird von einem kugelförmigen Ion in einem laminaren Fluss ausgegangen, so dass sich folgende Näherung der Reibungskraft F_r ergibt:

$$F_r = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ep} \quad (3-6)$$

- F_r : Reibungskraft [N]
 η : Viskosität der Elektrolytlösung [Pa·s]
 r_i : Stokes'scher Radius eines Ions i [m]
 v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit des Ions i $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$

Nach einer kurzen Beschleunigungsphase der Ionen bildet sich ein Kräftegleichgewicht aus.

$$F_{el} = F_r \quad (3-7)$$

- F_{el} : elektrische Kraft [N]
 F_r : Reibungskraft [N]

In diesem Kräftegleichgewicht bewegen sich schließlich die Ionen mit konstanter Geschwindigkeit v_{ep} , die durch Umformung der oben beschriebenen Formeln erhalten wird und der angelegten elektrischen Feldstärke E proportional ist.

$$v_{ep} = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (3-8)$$

- v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit des Ions i $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$
 z_i : Anzahl der Ladung pro Teilchen i
 e_0 : Elementarladung $[1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}]$
 E : elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$
 η : Viskosität der Elektrolytlösung [Pa·s]
 r_i : Stokes'scher Radius eines Ions i [m]

Um die Geschwindigkeit v_{ep} in eine versuchsunabhängige Größe zu überführen, wird der Quotient aus der Geschwindigkeit v_{ep} und der Feldstärke E berechnet, um die absolute elektrophoretische Mobilität μ_{ep} zu erhalten:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (3-9)$$

- μ_{ep} : absolute elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}\right]$
 v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit des Ions i $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$

E :	elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$
z_i :	Anzahl der Ladung pro Teilchen i
e_0 :	Elementarladung $[1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}]$
η :	Viskosität der Elektrolytlösung $[\text{Pa} \cdot \text{s}]$
r_i :	Stokes'scher Radius eines Ions i $[\text{m}]$

Die Gleichung (3-9) ist nicht direkt berechenbar, da einige Parameter nicht unmittelbar zugänglich sind und nicht in unendlich verdünnter Lösung gearbeitet wird. Somit muss der Einfluss der umgebenden Elektrolytlösung berücksichtigt werden. Ferner stellen die Ermittlung der Ladungsanzahl der Teilchen i z_i und der Stokes'sche Radius r_i , also der hydrodynamische Radius des Teilchens, der nicht mit dem messbaren Ionenradius im Kristallgitter korreliert [92], Limitierungen dar.

Eine Approximation der absoluten elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} stellt eine experimentell ermittelte elektrophoretische Mobilität μ_{ex} dar [92]:

$$\mu_{ex} = \frac{L_{eff}}{E \cdot t_m} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{U \cdot t_m} \quad (3-10)$$

μ_{ex} :	experimentelle elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}\right]$
L_{eff} :	effektive Kapillarlänge (Kapillarlänge bis zum Detektor) $[\text{m}]$
E :	elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$
t_m :	Migrationszeit $[\text{s}]$
L_{ges} :	gesamte Kapillarlänge $[\text{m}]$
U :	Spannung $[\text{V}]$

3.1.5 Elektroosmotischer Fluss

Das angelegte elektrische Feld E ist nicht nur ursächlich für die elektrophoretische Mobilität der Analyteilchen μ_{ep} , sondern es induziert auch die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses (EOF) bedingt durch eine elektrische Doppelschicht entlang der Phasengrenze der Innenoberfläche der *fused-silica* Kapillare und der Elektrolytlösung.

Die Silanolgruppen der Kieselglaskapillare sind bei pH-Werten über 2 je nach pH-Wert mehr oder weniger stark dissoziiert, so dass sich eine negative Oberflächenladung ausbildet. Durch Anlagerung von Kationen der Elektrolytlösung bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus [93, 94]. Diese Doppelschicht setzt sich aus einer starren Stern-Schicht, bei der Kationen an der negativ geladenen Silanoloberfläche adsorbiert werden, und einer Gouy-Chapman-Schicht zusammen. Die Kationen der Stern-Schicht können die Silanoloberfläche nicht vollständig neutralisieren, so dass weitere Kationen der Elektrolytlösung angelagert werden. Diese in der diffusen Gouy-Chapman-Schicht befindlichen Kationen sind nicht fest an die Oberfläche gebunden und folglich beweglich. Die Konzentration der in der Kapillare befindlichen Kationen nimmt im Querschnitt der Kapillare in der diffusen Schicht exponentiell mit dem Abstand von der Oberfläche ab [93]. Durch den Überschuss an Kationen an der Scherebene zur Stern-Schicht bewirkt das Anlegen eines elektrischen Feldes eine Bewegung der diffusen Schicht in Richtung der Kathode. Bis auf den Bereich der diffusen Schicht, in der sich die Geschwindigkeit mit dem Abstand zur Kapillarwand steigert, weist der elektroosmotische Fluss eine

konstante Geschwindigkeit über den Querschnitt der Kapillare auf [94]. Durch diese konstante Geschwindigkeit des Flusses entsteht ein flaches, fast stempelförmiges Strömungsprofil zur Kathode hin [94, 95].

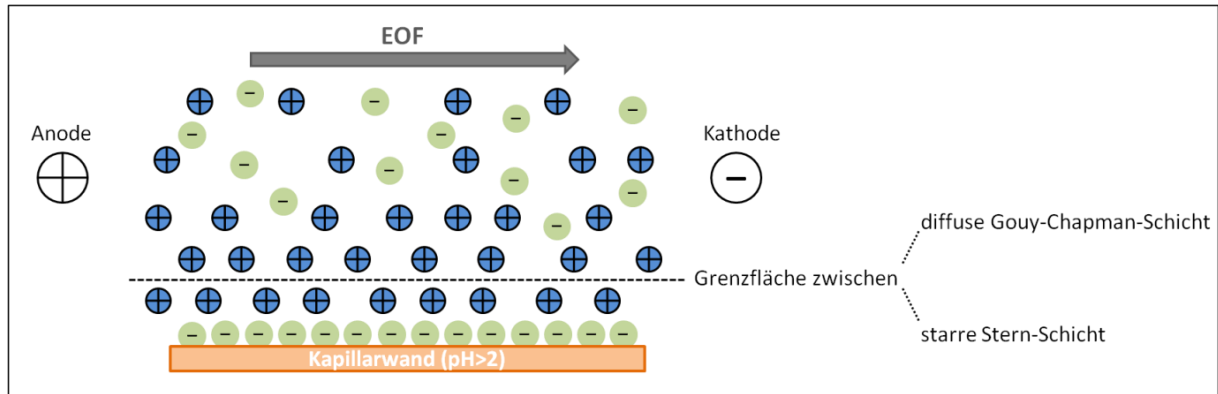


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Entstehung des elektroosmotischen Flusses

Das stempelförmige Strömungsprofil trägt zur hohen Trennleistung der Kapillarelektrophorese bei. Folglich kommt es zu keiner zusätzlichen Bandenverbreiterung durch Radialdiffusion. Eine Bandenverbreiterung ist dagegen bei parabolischen Strömungsprofilen vorzufinden. Diese parabolischen Strömungsprofile sind unter anderem bei Spülprozessen der CE oder bei der HPLC (*high performance liquid chromatography*; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) zu finden. Die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses v_{EOF} wird durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung beschrieben [95]:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (3-11)$$

v_{EOF} : Geschwindigkeit des EOFs $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}} \right]$

ε : Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{\text{A} \cdot \text{s}}{\text{V} \cdot \text{m}} \right]$

ζ : Zeta-Potential [V]

E : elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}} \right]$

η : Viskosität der Elektrolytlösung [Pa·s]

Das in Gleichung (3-11) einfließende ζ -Potential beschreibt das elektrische Potential an der Scherebene innerhalb der diffusen Schicht. Dieses Potential ist dabei abhängig von der Oberflächenladungsdichte und der Ausdehnung der diffusen Schicht und somit pH-abhängig.

$$\zeta = \frac{\sigma}{\kappa \cdot \varepsilon} \quad (3-12)$$

ζ :	Zeta-Potential [V]
σ :	Ladungsdichte an der Kapillaroberfläche $\left[\frac{\text{A}\cdot\text{s}}{\text{m}^2}\right]$
κ :	Debye-Hückel-Parameter $[\text{m}^{-1}]$
ε :	Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{\text{A}\cdot\text{s}}{\text{V}\cdot\text{m}}\right]$

Der reziproke Wert des in Gleichung (3-12) einfließenden Debye-Hückel-Parameters (κ^{-1}) beschreibt die Dicke der diffusen Schicht und wird durch Formel (3-13) beschrieben.

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 \cdot F^2}{\varepsilon \cdot R \cdot T} \cdot IS} \quad (3-13)$$

κ :	Debye-Hückel-Parameter $[\text{m}^{-1}]$
F :	Faraday-Konstante $\left[96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}\right]$
ε :	Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{\text{A}\cdot\text{s}}{\text{V}\cdot\text{m}}\right]$
R :	allgemeine Gaskonstante $\left[8,3144621 \frac{\text{J}}{\text{mol}\cdot\text{K}}\right]$
T :	absolute Temperatur [K]
IS :	Ionenstärke $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$

$$IS = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^n c_i \cdot z_i^2 \quad (3-14)$$

IS :	Ionenstärke $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_i :	molare Konzentration einer Probensubstanz i $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
z_i :	Anzahl der Ladung pro Teilchen i

Die oben beschriebenen Gleichungen zeigen den komplexen Zusammenhang der EOF-Geschwindigkeit v_{EOF} mit dem angelegten elektrischen Feld E , dem pH-Wert und der Ionenstärke IS der Elektrolytlösung.

Aus der Geschwindigkeit des EOFs v_{EOF} lässt sich ebenfalls eine Mobilität, die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} , berechnen:

$$\mu_{EOF} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (3-15)$$

μ_{EOF} :	elektroosmotische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$
v_{EOF} :	Geschwindigkeit des EOFs $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$

E :	elektrische Feldstärke $\left[\frac{\text{V}}{\text{m}}\right]$
ε :	Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{\text{A}\cdot\text{s}}{\text{V}\cdot\text{m}}\right]$
ζ :	Zeta-Potential [V]
η :	Viskosität der Elektrolytlösung [Pa·s]

3.1.6 Effektive elektrophoretische Mobilität

Durch die beschriebenen Bewegungen in der Kapillare, die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} des Ions und die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} der Elektrolytlösung resultiert eine effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} der Teilchen im jeweiligen System:

$$\mu_{eff} = \mu_{EOF} + \mu_{ep} \quad (3-16)$$

μ_{eff} :	effektive elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$
μ_{EOF} :	elektroosmotische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$
μ_{ep} :	absolute elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$

Durch Vorliegen des EOFs werden somit nicht nur Kationen zur Kathode wandern, sondern auch Neutralteilchen und Anionen zu dieser bewegt. Wie bereits durch die Formeln beschrieben, migrieren somit in Abhängigkeit der Ladungsanzahl mehrfach geladene Kationen schneller als einfach geladene und dabei, auf Grund geringerer Reibung, kleinere schneller als Teilchen mit einem größeren Radius. Den Kationen folgen die Neutralteilchen, die in der CZE nicht aufgetrennt werden können und mit dem EOF migrieren. Zuletzt erfolgt eine Auftrennung der Anionen, sofern deren negative elektrophoretische Mobilität μ_{ep} vom Betrag kleiner ist als die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} . Einfach geladene Anionen können hierbei schneller migrieren als mehrfach geladene Anionen, da diese eine geringere negative elektrophoretische Mobilität μ_{ep} aufweisen, die der elektroosmotischen Mobilität μ_{EOF} entgegengesetzt ist.

Weitere Parameter, die aus den oben beschriebenen Formeln ersichtlich werden und einen Einfluss auf die Gesamtmobilität μ_{eff} haben, sind der pH-Wert und die Konzentration des BGEs, die Temperatur, das elektrische Feld E und besonders die Kapillaroberfläche.

4 Affinitätskapillarelektrophorese

Die Affinitätskapillarelektrophorese ist eine Sammlung verschiedener Methoden, von denen die am meisten verwendeten in den nachfolgenden Unterkapiteln näher beschrieben werden. Mit dieser Technik können mit den Vorteilen der CE in meist gut zu etablierenden Methoden unterschiedliche Analyt-Ligand-Interaktionen untersucht werden.

Vorteile der CE sind geringe Analysenzeiten, geringe Proben- und Reagenzienmengen, sowie die fehlende Notwendigkeit organische Lösemittel einzusetzen [15, 96, 97]. Dabei zeigen die im Folgenden besprochenen Methoden jeweils unterschiedliche Stärken und stellen unterschiedliche Anforderungen an die Liganden und das Trennsystem (siehe Tabelle 4-1). Bei den Methoden werden entweder der freie Analyt oder der entstehende Komplex aus Analyt und Ligand als Messparameter näher untersucht [98]. Zur Untersuchung der Affinitäten werden bei der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) und der *Vacancy* Affinitätskapillarelektrophorese (VACE) die Mobilitäten der Analyten betrachtet. Bei der Hummel-Dreyer Affinitätskapillarelektrophorese (HD) und der *Vacancy Peak* Methode (VP) werden die Peakflächen und bei der *Frontal Analysis* Methode (FA) die Plateauhöhen als Messparameter zur Affinitätsuntersuchung herangezogen [98]. Eine externe oder interne Kalibrierung ist bei der HD-, VP- und FA-Methode zur Interaktionsauswertung nötig, wohingegen bei der ACE- und VACE-Methode Änderungen der elektrophoretischen Analytmobilität in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration betrachtet werden und somit keine Kalibrierung notwendig ist [99].

Vorteile der Affinitätskapillarelektrophorese im Vergleich zu anderen Methoden (siehe Abschnitt 4.3) sind die Flexibilität in der Auswahl des Puffersystems und die Möglichkeit verschiedene Reagenzien zuzusetzen. Reagenzienzusätze sind aber nicht zwingend erforderlich, genauso wie keine speziellen Kits zur Proteinanalytik erworben werden müssen.

In vielen Methoden der Affinitätskapillarelektrophorese ist es zudem noch nicht einmal erforderlich reine Analyten einzusetzen, da die Untersuchung auf dem Trennprinzip der CZE beruht und folglich durch eine geeignete Methode auch unreine, beziehungsweise zusammengesetzte Proben, untersucht werden können. Verunreinigungen oder andere Analyten beeinflussen die Interaktionsuntersuchungen bei Verwendung einer geeigneten Trennmethode demzufolge nicht. Die Nachteile, die sich aus den Grundprinzipien der CE ergeben, sind somit einerseits die geringe Sensitivität, die durch die in den nachfolgend beschriebenen Versuchen angewandte UV-Detektion bedingt ist, und andererseits mögliche Adsorptionsvorgänge an der Kapillarwand.

4.1 Methoden der Affinitätskapillarelektrophorese

4.1.1 *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese

Bei der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) handelt es sich um die am meisten verwendete Technik zur Untersuchung von Protein-Arzneistoff-Interaktionen [96]. Bei dieser Methode wird der zu untersuchende Analyt in geringer und konstanter Menge injiziert und der Ligand wird im Hintergrundelektrolyt, also dem jeweiligen Laufpuffer, gelöst [98]. In den durchgeführten Versuchen wird die Migrationszeit des Proteins als Analyt bestimmt und verschiedene Ionen als Liganden dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt. Untersucht werden dabei Mobilitätsveränderungen des Analyten in verschiedenen Trennungen mit variierender Ligandenkonzentration im Laufpuffer, so dass die elektrophoretische Mobilität des Analyten in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration bestimmt wird [100]. Die Variation der Ligandenkonzentration führt somit zu unterschiedlichen Mobilitäten, wenn eine schnelle Assoziation beziehungsweise Dissoziation vorliegt [96]. Dabei wird zunächst die

Eigenmobilität im vorliegenden System durch Trennung im puren Laufpuffer, also ohne Ligandenzusatz, bestimmt. In weiteren Trennungen erfolgt dann durch Interaktion mit dem im Laufpuffersystem vorliegenden Liganden eine Veränderung der Mobilität, die vorrangig durch eine Veränderung der Ladung bedingt ist und weniger durch eine Massenveränderung, da diese wegen der im Vergleich zum Analyten meist kleinen Liganden weniger ins Gewicht fällt [101]. Durch Variation der Ligandenkonzentration im Laufpuffer können folglich unterschiedliche Mobilitäten aufgezeichnet werden. Bei Vorliegen bestimmter Voraussetzungen (siehe Abschnitt 4.2.3) können mit Hilfe der detektierten Mobilitäten Bindungskonstanten berechnet werden.

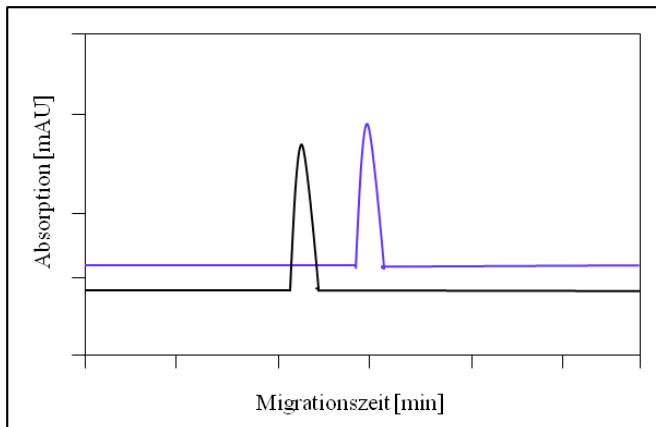


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung von zwei Elektropherogrammen nach der ACE-Methode. Das schwarze Elektropherogramm stellt den Analyten in purem Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm unter Ligandenzusatz im Laufpuffer dar.

4.1.2 Hummel-Dreyer Affinitätskapillarelektrophorese

Die Hummel-Dreyer Affinitätskapillarelektrophorese (HD) verwendet als Messgröße die Peakflächen. Die Durchführung erfolgt, indem die Kapillare mit dem Laufpuffer gefüllt ist, dem ein UV-absorbierender Ligand zugesetzt wurde, wodurch eine hohe Hintergrundabsorption entsteht [98]. Die Konzentration des Liganden wird in verschiedenen Läufen variiert und der Analyt mit gleichbleibender Konzentration injiziert. Die erhaltenen Elektropherogramme weisen eine Peak-Gruppe bestehend aus dem Analyt-Ligand-Komplex und freiem Analyten auf, die eine ähnliche beziehungsweise gleiche Mobilität aufweisen müssen. Der zweite Peak ist ein negativer Peak mit der entsprechenden Migrationszeit des Liganden. Der negative Peak entsteht durch eine Verringerung der Ligandenkonzentration in seiner eigentlichen Migrationszone durch Interaktion mit dem Analyten, wodurch an dieser Stelle das Hintergrundsignal des im Puffer befindlichen UV-absorbierenden Liganden reduziert wird [102]. Durch die Erhöhung der Ligandenkonzentration im Laufpuffer in den darauf folgenden Läufen verringert sich die negative Peakfläche. Dies ist auf das veränderte Verhältnis der Analyt-Ligand-Konzentration zurückzuführen, da anteilsweise durch die erhöhte Ligandenkonzentration weniger Liganden eine Interaktion mit dem Analyten eingehen. Zur Berechnung des gebundenen Liganden wird die negative Peakfläche des Liganden in Bezug gesetzt zur Liganden-Peakfläche aus einem Lauf ohne Analytinjektion, da die negative Peakfläche proportional zur freien Ligandenkonzentration ist [98].

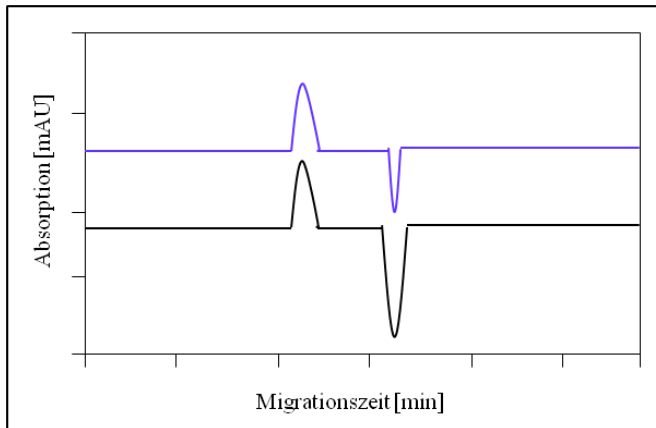


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung von zwei Elektropherogrammen nach der HD-Methode. Das schwarze Elektropherogramm zeigt den positiven Peak des Analyt-Ligand-Komplexes und Analyten, sowie den negativen Peak, dem Liganden entsprechend, im BGE mit UV-absorbierendem Ligand. Das blaue Elektropherogramm zeigt die Verringerung des negativen Peaks durch Erhöhung der Ligandenkonzentration im Puffer.

4.1.3 Frontal Analysis Affinitätskapillarelektrophorese

Die Kapillare in der *Frontal Analysis* Methode (FA) wird zuerst mit purem Laufpuffer gefüllt. Injiziert wird eine relativ große Probenmenge, in der sich Analyt und Ligand im Gleichgewicht befinden. Folglich liegen in der Probe nebeneinander freier Analyt, freier Ligand und ein Analyt-Ligand-Komplex vor [98]. Wie auch bei der nachfolgend beschriebenen *Vacancy Peak* Affinitätskapillarelektrophorese wird angenommen, dass der Analyt und der Analyt-Ligand-Komplex ungefähr die gleiche Mobilität aufweisen und sich die Ligandenmobilität davon unterscheidet [15, 103]. Das Elektropherogramm zeigt auf Grund der großen Injektionsmenge zwei Plateaus, wovon das eine Plateau den freien Analyten und den gebildeten Komplex darstellt und das andere Plateau in der Höhe die freie Ligandenkonzentration widerspiegelt. Diese beiden Plateauzonen können sich durch das bereits eingestellte Gleichgewicht und einer schnellen Assoziations- und Dissoziationskinetik überlagern [103]. Die freie Ligandenkonzentration kann mittels einer zuvor durchgeführten Kalibration bestimmt werden. Aus der bekannten Gesamtligandenkonzentration und der gemessenen freien Ligandenkonzentration können die Assoziationsparameter ermittelt werden [98].

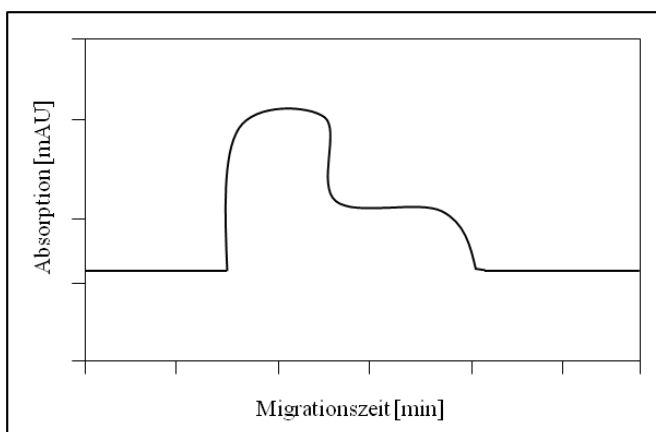


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung eines Elektropherogramms nach der FA-Methode. Das erste Plateau repräsentiert den freien Analyt und den Analyt-Ligand-Komplex und das zweite Plateau den freien Liganden.

4.1.4 Vacancy Peak Affinitätskapillarelektrophorese

Bei dieser Methode der Affinitätskapillarelektrophorese wird die Kapillare mit dem Puffer gefüllt, in dem sich sowohl UV-absorbierender Analyt als auch Ligand befinden. In Folge dessen liegt eine hohe Hintergrundabsorption vor. Injiziert wird bei der *Vacancy Peak* Affinitätskapillarelektrophorese (VP) nur pure Pufferlösung. Die Konzentration des Liganden wird in verschiedenen Läufen variiert während die Analytkonzentration gleich bleibt [98, 103]. Durch die Injektion von purem Puffer entstehen die sogenannten *Vacancies* (Lücken) im Hintergrundsignal, wodurch zwei negative Peaks im Elektropherogramm sichtbar werden [104, 105]. Ein Peak entspricht dabei dem Analyt-Ligand-Komplex und dem freien Analyten und ein zweiter negativer Peak dem freien Liganden [103, 105]. Dieser Peak steht im direktem Zusammenhang mit der Menge an freiem Liganden in jedem verwendeten Puffersystem [98]. Durch die Verwendung der Peakflächen und dem direkten Zusammenhang zur freien Ligandenkonzentration lässt sich mit dieser Methode auch die Stöchiometrie des Analyt-Ligand-Komplexes berechnen. Dazu wird die Menge des freien, gemessenen Liganden, die totale Ligandenkonzentration und die totale Analytkonzentration verwendet, um die Menge des gebundenen Analyten zu bestimmen und folglich eine Relation zur Bindungsstöchiometrie zu ermitteln [98].

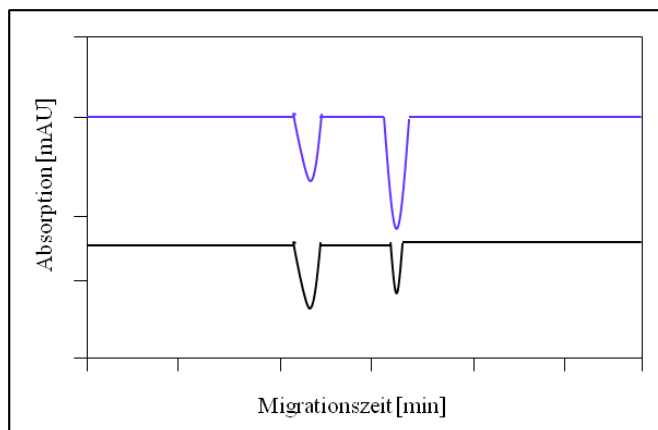


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung von zwei Elektropherogrammen nach der VP-Methode. Das schwarze Elektropherogramm zeigt den negativen Peak des Analyt-Ligand-Komplexes und Analyten, sowie den negativen Peak, dem Liganden entsprechend, im BGE mit UV-absorbierendem Analyten und Liganden. Das blaue Elektropherogramm zeigt die Vergrößerung des negativen Liganden-Peaks durch Erhöhung der Ligandenkonzentration im Puffer.

4.1.5 Vacancy Affinitätskapillarelektrophorese

Die *Vacancy* Affinitätskapillarelektrophorese (VACE) ist in ihrem experimentellen Aufbau identisch zur VP Methode [98]. Genau wie in der VP wird pure Pufferlösung injiziert und im Laufpuffer liegen Analyt und Ligand vor, so dass ebenfalls zwei negative Peaks erhalten werden. Die Konzentration des Liganden wird in unterschiedlichen Läufen variiert [105]. Vergleichbar zur ACE werden zur Bestimmung der Interaktion Mobilitätsveränderungen betrachtet. Die Auswertung ist somit gleichzusetzen mit der ACE Methode, da die Migrationszeiten als Parameter herangezogen werden [98].

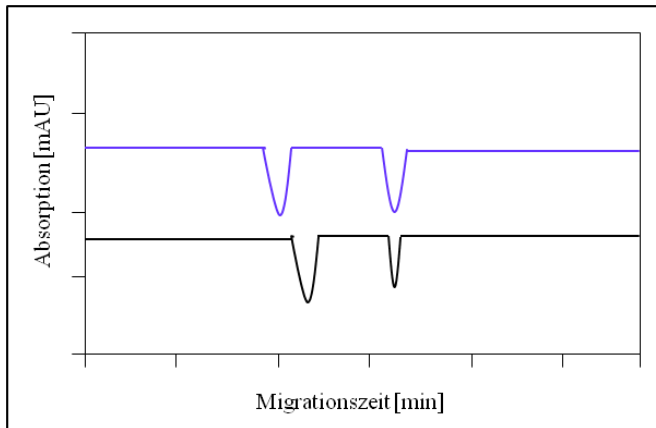


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung von zwei Elektropherogrammen nach der VACE-Methode. Das schwarze Elektropherogramm zeigt den negativen Peak des Analyten, sowie den negativen Peak, dem Liganden entsprechend, im BGE mit UV-absorbierendem Analyten und Liganden. Das blaue Elektropherogramm zeigt die veränderte Mobilität des negativen Analyten-Peaks durch Erhöhung der Ligandenkonzentration im Puffer.

Tabelle 4-1: Kurze Zusammenfassung der verschiedenen Affinitätskapillarelektrophorese-Methoden; modifiziert nach [15]

Methode	ACE	HD	FA	VP	VACE
Versuchsaufbau					
Auswertungsparameter	Mobilität	Peakfläche	Plateauhöhe	Peakfläche	Mobilität
Anforderungen an Mobilitäten	$\mu_{\text{Komplex}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$	$\mu_{\text{Komplex}} = \mu_{\text{Analyt}}$ $\mu_{\text{Ligand}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$ μ_{Komplex}	$\mu_{\text{Komplex}} = \mu_{\text{Analyt}}$ $\mu_{\text{Ligand}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$ μ_{Komplex}	$\mu_{\text{Komplex}} = \mu_{\text{Analyt}}$ $\mu_{\text{Ligand}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$ μ_{Komplex}	$\mu_{\text{Ligand}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$ $\mu_{\text{Komplex}} \neq \mu_{\text{Analyt}}$
UV-absorbierender Ligand	nicht notwendig	notwendig	notwendig	notwendig	notwendig
bestimmbare Bindungskinetik	schnell	schnell	schnell und langsam	schnell	schnell

4.1.3 Gründe zur Auswahl der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese

Zur Überprüfung von Protein-Interaktionen wurde in der vorliegenden Arbeit die *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese angewendet. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, dass die Mobilitäten und deren Verhältnisse zueinander vom Analyten, Liganden und dem Komplex nicht bekannt sein müssen, zum anderen können nicht UV-absorbierende Liganden verwendet werden. Des Weiteren ist auf Grund der Vergleichsmessungen keine Kalibrierung notwendig. Für die vorliegende

Arbeit sollte der Einfluss des Liganden auf das Protein gemessen werden, der durch die Mobilitätsveränderung gut bestimmt werden kann. Zudem ist die Entwicklung einer Methode für verschiedene Probengemische und sogar unreine Proben relativ einfach durchführbar, da für diese zuerst eine einfache CZE durchgeführt werden kann, was den Einsatz als Screening-Methode vorteilhaft gestaltet.

4.2 Durchführung der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese

Bei den durchgeführten ACE-Versuchen wurde das zu untersuchende Protein als Analyt in die Kapillare injiziert und die entsprechenden Ionen in der angegebenen Konzentration im Laufpuffer gelöst. Für alle getesteten Interaktionspaare wurde ein Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) mit einem pH von 7,4 und einer Konzentration von 20 mmol/l verwendet. Zudem wurde ein Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 12,5 mmol/l und einem pH von 7,4 für die Interaktionsuntersuchungen von BSA, β -Lactoglobulin und Ovalbumin mit Bernsteinsäure und Glutaminsäure eingesetzt (siehe Abschnitt 7). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm, da in diesem Bereich die Peptidbindungen stark UV-Licht absorbieren.

Zu Beginn der Arbeit ergaben sich Analysenserien mit purem Laufpuffer, 5 $\mu\text{mol/l}$ Ion im Laufpuffer, 10 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 250 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$. Dieser Versuchsaufbau wurde nach einigen Versuchsserien mit Anwendung der Konfidenzintervalle als Auswertungsparameter (siehe Abschnitt 4.2.4) auf den puren Laufpuffer und zwei verschiedene Ionenkonzentrationen (entweder 100 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$ oder 250 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$) verkürzt. Die Darstellung der Ergebnisse bezieht sich auf die Versuche mit dem puren Laufpuffer und einer angegebenen Ligandenkonzentration, wobei pro Protein jeweils die gleiche Ligandenkonzentration für eine Ligandengruppe verglichen wird. Durch den Vergleich bei gleicher Ligandenkonzentration wird auch die Ionenstärke für die jeweilig getestete Ligandengruppe konstant gehalten. Somit kann ein Einfluss auf das Protein durch variierende Ionenstärken ausgeschlossen werden. Jede Konzentration wurde sechs Mal vermessen.

4.2.1 EOF-Marker

Da Bindungskonstanten und elektrophoretische Mobilitäten (siehe Abschnitt 3.1.4 - 3.1.6) unter anderem stark von der Temperatur, der Viskosität und der Ionenstärke der Lösung abhängen, wurde zur besseren Kontrolle des Systems ein EOF-Marker, Acetanilid, eingesetzt. Durch die Einbeziehung der Markermobilität im jeweiligen vermessenen Puffersystem werden die Veränderungen durch die variierende Ionenkonzentration ausgeglichen [100, 106, 107]. Zu diesem Zweck werden Mobilitätsquotienten (*mobility ratios*) R gebildet, die den Quotienten der Migrationszeit des EOF-Markers t_{eof} und der Migrationszeit des Proteins t_{prot} darstellen. Zur Berechnung dieses Verhältnisses können auf Grund der gleichbleibenden Versuchsbedingungen (siehe Formel (3-10)) direkt die Migrationszeiten eingesetzt werden:

$$R = \frac{t_{eof}}{t_{prot}} \quad (4-1)$$

- R*: Mobilitätsquotient
t_{eof}: Migrationszeit des Acetanilids [min]
t_{prot}: Migrationszeit des Proteins [min]

4.2.2 Mobilitätsquotienten

Bei der Bestimmung von Protein-Ionen-Interaktionen werden im Folgenden zwei verschiedene Mobilitätsquotienten *R* benötigt. Zum einen wird in jeder Analyse der *R_f*-Wert bestimmt, der den Quotienten ohne Ligandenzusatz im Laufpuffer beschreibt, also das freie Protein. Zum anderen wird ein *R_i*-Wert bestimmt, bei dem die Migrationszeiten bei einer bestimmten, definierten Ligandenkonzentration verwendet werden.

4.2.3 Bindungskonstanten

Mit Hilfe der ACE können Bindungskonstanten berechnet werden, sofern eine 1:1 Bindungsstöchiometrie vorliegt [98, 106, 108, 109]. Die Bindungskonstante *K_a* kann somit durch folgende Gleichung beschrieben werden [108]:

$$K_a = \frac{c_{AL}}{c_A \cdot c_L} \quad (4-2)$$

- K_a*: Bindungskonstante $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_{AL}: molare Konzentration des Analyt-Ligand-Komplexes $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_A: molare Konzentration des freien Analyten $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
c_L: molare Konzentration des freien Liganden $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$

Um die Bindungskonstante *K_a* aus durchgeführten ACE-Versuchen berechnen zu können, gibt es in der Literatur vier verschiedene mathematische Modelle [110, 111]. In Referenz [106] hat sich die nicht-lineare Regression als beste Methode herausgestellt und wird durch folgende Formel beschrieben:

$$K_a = \frac{R_f - R_i}{R_i - R_c} \quad (4-3)$$

- K_a*: Bindungskonstante $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
R_f: Mobilitätsquotient in purem Laufpuffer
R_i: Mobilitätsquotient in Gegenwart einer definierten Ligandenkonzentration
R_c: Mobilitätsquotient in einem vollständig gesättigten System

Der R_c -Wert ist der Quotient der Migrationszeiten des EOF-Markers und des Analyt-Ligand-Komplexes in einem vollständig gesättigten System [106, 109]. Dieser R_c -Wert ist die zweite Limitierung in der Berechnung der Bindungskonstante neben der Notwendigkeit einer 1:1 Bindung. Die Schwierigkeit liegt hierbei in der Bestimmung des Wertes, da dafür unter anderem ein Marker notwendig ist, der komplett am Protein bindet [106].

Eine Auswahl der durchgeführten Versuche wurde durch zwei unterschiedliche Methoden auf eine 1:1 Bindung untersucht.

Zum einen wurde für eine grobe Einschätzung die theoretische Ladungsänderung von BSA und β -Lactoglobulin durch eine Metallionen-Interaktion berechnet. Hierfür wurde die Proteinladung bei einem pH-Wert von 7,4 mit dem *Protein Calculator v3.3* (www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html) geschätzt. Um die Ladungsveränderung durch Interaktion zu ermitteln wurden die elektrophoretischen Mobilitäten (Formel (3-10)) mit den Ladungen ins Verhältnis gesetzt. Durch Verwendung der gleichen Versuchsbedingungen (L_{eff} , L_{ges} , U) können somit gleich die Migrationszeiten ins Verhältnis gesetzt werden. Die errechneten Ladungen von BSA und β -LG betragen bei pH 7,4 -14 und -7,5. Durch 250 $\mu\text{mol/l}$ Kupferchlorid im Laufpuffer ergibt sich beim BSA eine Ladung von -21,25 und durch 250 $\mu\text{mol/l}$ Bariumchlorid -15,96. Bei β -LG ist die Ladungsveränderung nicht so deutlich ausgeprägt, hier liegt bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Kupferchlorid im Laufpuffer eine Ladung von -8,08 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Bariumchlorid -7,56 vor. Diese ungleichen Ladungsveränderungen deuten darauf hin, dass keine 1:1 Bindung vorliegen kann.

Zum anderen wurde eine Berechnung mit Hilfe eines x-reziproken Plots, der dem Scatchard Plot entspricht [112], als beste Methode zur Überprüfung einer 1:1 Bindungsstöchiometrie beschrieben [113, 114].

$$\frac{\mu_{ep,A} - \mu_A}{c_L} = -K_a (\mu_{ep,A} - \mu_A) + K_a (\mu_{AL} - \mu_A) \quad (4-4)$$

- $\mu_{ep,A}$: erscheinende elektrophoretische Mobilität des Analyten in Gegenwart einer definierten Ligandenkonzentration $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$
- μ_A : Mobilität des Analyten in freier Form $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$
- c_L : molare Konzentration des freien Liganden $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
- K_a : Bindungskonstante $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
- μ_{AL} : Mobilität des Analyt-Ligand-Komplexes in einem vollständig gesättigten System $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}\right]$

Ein nicht Vorliegen einer 1:1 Bindungsstöchiometrie wird bei einer graphischen Auswertung beim Auftragen von $\frac{\mu_{ep,A} - \mu_A}{c_L}$ gegen $\mu_{ep,A} - \mu_A$ in einer Nichtlinearität sichtbar. Eine stichprobenartige Auswertung verschiedener Interaktionen wurde von Claudia Cianciulli durchgeführt. Die in Abbildung 4-6 gezeigten Graphen zeigen die x-reziproken Plots der Interaktionen von Ephedrinhydrochlorid mit den drei getesteten Proteinen BSA, β -Lactoglobulin und Ovalbumin. Für die Berechnung wurde jeweils eine Versuchsserie herangezogen, bei der fünf verschiedene Konzentrationen des Ephedrinhydrochlorids eingesetzt wurden. Somit ergaben sich Läufe mit purem Tris-Puffer, 10 $\mu\text{mol/l}$ Ephedrinhydrochlorid, 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$. Zur Berechnung der x-reziproken Plots wurde auf die EOF-Mobilität normiert, um Variationen, die sich aus der veränderten Pufferzusammensetzung ergeben können, auszuschließen (siehe Abschnitt 4.2.1

und 4.2.2). Somit zeigen die Plots in Abbildung 4-6 die verschiedenen Mobilitäten in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration.

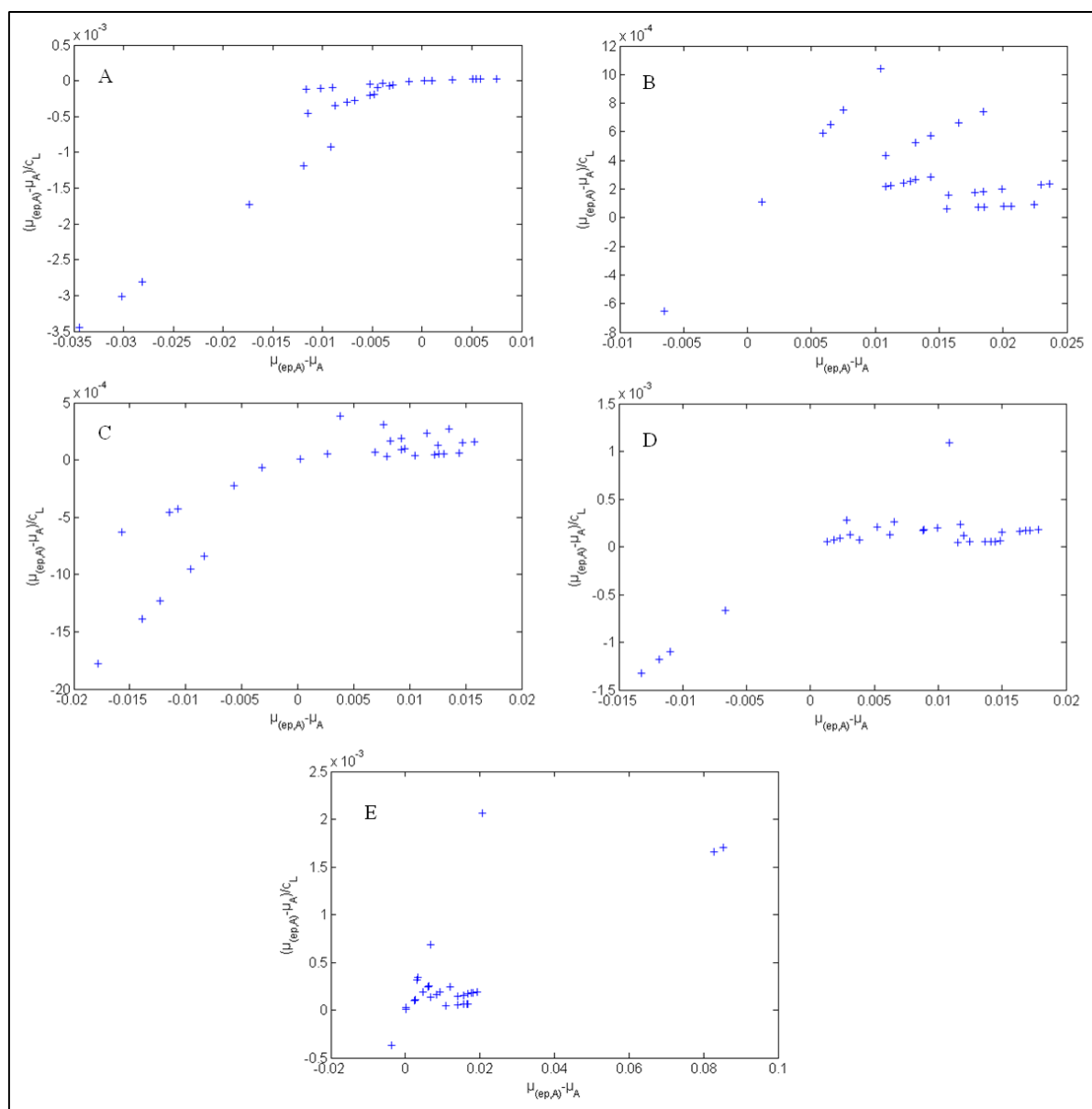


Abbildung 4-6: x-reziproke Plots der Interaktionen mit Ephedrinhydrochlorid

A: BSA

B: β -Lactoglobulin

C: Ovalbumin Isoform 1

D: Ovalbumin Isoform 2

E: Ovalbumin Isoform 3

Da die stichprobenartige Auswertung verschiedener Interaktionen keine Linearität und somit keine 1:1 Bindungsstöchiometrie zeigte, wurde auf die Berechnung der Bindungskonstanten verzichtet. Allerdings ist eine Aussage über das Bindungsverhalten, also ob keine oder eine Bindung vorliegt, im Rahmen von Screenings sehr gut möglich. Hierzu wurde eine Berechnung von Konfidenzintervallen (siehe 4.2.4) in die Auswertung eingeführt.

4.2.4 Konfidenzintervalle

Die in den durchgeführten Versuchen erscheinenden Veränderungen der Proteinmobilitäten und der damit verbundenen Mobilitätsquotienten sind zum Teil nur gering ausgeprägt. Deshalb wurde zur Auswertung der untersuchten Interaktionen und Überprüfung der Signifikanz eine Berechnung eines Konfidenzintervalls für jedes untersuchte Interaktionspaar durchgeführt. Ein Konfidenzintervall gibt einen Vertrauensbereich an, in dem der unbekannte, gesuchte Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit von $1-\alpha$ liegt [115]. In den durchgeführten Berechnungen wurde ein zweiseitiger Vertrauensbereich mit einem 95%-Konfidenzintervall berechnet. Durch diese Bestimmung kann somit eine Aussage getroffen werden, ob die zum Teil recht geringen Migrationszeiten- und somit Mobilitätsveränderungen signifikant sind und folglich eine Interaktion widerspiegeln. Die aufgeführte Gleichung (4-6) zur Berechnung des Konfidenzintervalls einer Differenz wurde mit Referenz [116] von folgender Formel abgeleitet:

$$cnf(\Delta) = \Delta \pm t_{\alpha/2, n_1+n_2-2} \cdot \hat{\sigma}_{pool} \cdot \sqrt{\frac{4}{n_1+n_2}} \quad (4-5)$$

$cnf(\Delta)$:	Konfidenzintervall einer Differenz
Δ :	Differenz
$t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$:	Student-t-Verteilung mit einem zweiseitigen Vertrauensbereich
α :	Irrtumswahrscheinlichkeit
n_1 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)
n_2 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)
$\hat{\sigma}_{pool}$:	gepoolte Standardabweichung

$$cnf((R_i - R_f)/R_f) = ((R_i - R_f)/R_f) \pm \left(t_{\alpha/2, n_1+n_2-2} \cdot \hat{\sigma}_{total} \cdot \sqrt{\frac{2}{n_1+n_2}} \right) / R_f \quad (4-6)$$

$cnf((R_i - R_f)/R_f)$:	Konfidenzintervall der Differenz der Mobilitätsquotienten normiert auf R_f
$t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$:	Student-t-Verteilung mit einem zweiseitigen Vertrauensbereich
α :	Irrtumswahrscheinlichkeit
n_1 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)
n_2 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)
$\hat{\sigma}_{total}$:	totale Standardabweichung

Berechnet wird durch Gleichung (4-6) das Konfidenzintervall der auf den R_f -Wert normierten Differenz der Mobilitätsänderungsquotienten ($\Delta R/R_f$) unter Verwendung der Student-t-Verteilung $t_{\alpha/2, n_1+n_2-2}$ mit einem zweiseitigen Vertrauensbereich. Eine Normierung wird durchgeführt, um die Differenz der Mobilitätsquotienten besser vergleichen zu können. So können zum Beispiel zwei Differenzen gleich sein ($\Delta R_1 = \Delta R_2$), obwohl die Proteinmigrationszeiten unterschiedlich sind

($t_{prot1} \ll t_{prot2}$). Um bei solchen Fällen eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wird auf den R_f -Wert normiert $\left(\frac{R_{i1}-R_{f1}}{R_{f1}} > \frac{R_{i2}-R_{f2}}{R_{f2}} \right)$.

Durch den Vergleich der Mobilitätsänderungen aus verschiedenen Kapillarelektrophoreseläufen mit veränderter Pufferzusammensetzung werden die Freiheitsgrade durch die Anzahl der Läufe ohne Ligandenzusatz n_l und mit Ligandenzusatz im Laufpuffer n_2 durch n_l+n_2-2 beschrieben. Die Anzahl der Läufe beträgt im Regelfall sechs für beide betrachteten Pufferzusammensetzungen. Der Term $\hat{\sigma}_{total}$, der einen Schätzwert gekennzeichnet durch das „Dach“ \wedge darstellt, ist durch folgende aufeinander aufbauenden Formeln beschrieben:

$$\hat{\sigma}_{total}^2 = \hat{\sigma}_i^2 + \hat{\sigma}_f^2 \quad (4-7)$$

$\hat{\sigma}_{total}^2$: totale Varianz
 $\hat{\sigma}_i^2$: Varianz der Versuche mit Ligandenzusatz
 $\hat{\sigma}_f^2$: Varianz der Versuche ohne Ligandenzusatz

Die hierbei einfließenden Varianzen wurden einmal im Puffersystem mit Ligandenzusatz (i) und einmal ohne Ligandenzusatz (f) ermittelt.

$$\hat{\sigma}_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (4-8)$$

$\hat{\sigma}_x^2$: Varianz der Stichproben einer Grundgesamtheit x
 \bar{x} : arithmetischer Mittelwert
 x_i : Einzelmesswerte
 n : Stichprobenumfang

Durch die gleichbleibenden Versuchsbedingungen, die sich nur im Ligandenzusatz geringfügig verändern, kann folgende Gleichung (4-9) mit Verwendung der gepoolten Varianz σ_{pool}^2 (Gleichung (4-10)) angenommen werden:

$$\hat{\sigma}_{total}^2 \approx \hat{\sigma}_{pool(i)}^2 + \hat{\sigma}_{pool(f)}^2 \quad (4-9)$$

$\hat{\sigma}_{total}^2$: totale Varianz
 $\hat{\sigma}_{pool(i)}^2$: gepoolte Varianz der Versuche mit Ligandenzusatz
 $\hat{\sigma}_{pool(f)}^2$: gepoolte Varianz der Versuche ohne Ligandenzusatz

$$\hat{\sigma}_{pool}^2 = \frac{f_i \cdot \hat{\sigma}_i^2 + f_f \cdot \hat{\sigma}_f^2}{f_i + f_f} \quad (4-10)$$

$\hat{\sigma}_{pool}^2$:	gepoolte Varianz
f_i :	Freiheitsgrad der Versuche mit Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_i^2$:	Varianz der Versuche mit Ligandenzusatz
f_f :	Freiheitsgrad der Versuche ohne Ligandenzusatz
$\hat{\sigma}_f^2$:	Varianz der Versuche ohne Ligandenzusatz

In Gleichung (4-10) beschreiben die Terme f_i beziehungsweise f_f die Freiheitsgrade aus den Läufen mit einer bestimmten Ligandenkonzentration im Laufpuffer (i) und ohne Ligandenzusatz (f), also purer Laufpuffer.

Durch Gleichung (4-9) kann nun folgende Näherung aufgestellt werden:

$$\hat{\sigma}_{total}^2 = 2 \hat{\sigma}_{pool}^2 \quad (4-11)$$

$\hat{\sigma}_{total}^2$:	totale Varianz
$\hat{\sigma}_{pool}^2$:	gepoolte Varianz

Somit zeigt sich die Übereinstimmung der Gleichungen (4-5) und (4-6) durch folgenden Zusammenhang:

$$\hat{\sigma}_{total} \cdot \sqrt{\frac{2}{n_1+n_2}} = \sqrt{2} \hat{\sigma}_{pool} \cdot \sqrt{\frac{2}{n_1+n_2}} = \hat{\sigma}_{pool} \cdot \sqrt{\frac{4}{n_1+n_2}} \quad (4-12)$$

$\hat{\sigma}_{total}$:	totale Standardabweichung
n_1 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (1)
n_2 :	Stichprobenumfang einer Versuchsserie (2)
$\hat{\sigma}_{pool}$:	gepoolte Standardabweichung

Durch die gute Präzision, die in der Kapillarelektrophorese erreicht werden kann und in den durchgeführten Versuchen bei 90% der Mobilitätsquotienten eine prozentuale relative Standardabweichung ($RSD\%$; Variationskoeffizient) von unter 2 und bei 79% der Versuche sogar unter 1 erbrachte, ergeben sich kleine Konfidenzintervalle. Die Präzision beschreibt die Streuung von Messwerten innerhalb einer Messreihe und überprüft somit auf eine möglichst große Übereinstimmung der Messwerte [117]. Im Regelfall wird zur Beschreibung der Präzision die Varianz $\hat{\sigma}_x^2$ (Formel (4-8)), die Standardabweichung $\hat{\sigma}_x$ oder als normierte und somit vergleichbare Größe die prozentuale relative Standardabweichung $RSD\%$ verwendet [117].

$$RSD\% = \frac{\hat{\sigma}_x}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (4-13)$$

$RSD\%$:	prozentuale relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)
$\hat{\sigma}_x$:	Standardabweichung der Stichproben einer Grundgesamtheit x
\bar{x} :	arithmetischer Mittelwert

Eine signifikante Interaktion zwischen dem untersuchten Protein und dem getesteten Ion liegt dann vor, wenn das Konfidenzintervall die x-Achse nicht schneidet. Demzufolge können Interaktionen durch die Berechnung der Konfidenzintervalle auch dann als signifikant nachgewiesen werden, wenn die Änderung der Mobilität gering erscheint. Ebenso kann eine Bindung eine wichtige biologische Funktion haben, obwohl die Mobilität nur wenig beeinflusst wird.

4.3 Andere Methoden zur Affinitätsbestimmung

Bindungen von verschiedenen Liganden zu Proteinen können mit einer Reihe anderer Methoden, wie NMR [11, 12], Kristallstrukturanalyse (*X-ray crystallography*) [13] oder Affinitätschromatographie [14], durchgeführt werden. Eine häufig verwendete und auch häufig mit ACE verglichene Methode ist die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Beiden Methoden gemein ist die Durchführung in einer relativ frei wählbaren Pufferlösung ohne umständliche Vorbehandlung von Protein oder Ligand.

Diese kalorimetrische Methode bestimmt die Temperaturunterschiede, die bei Bindungsreaktionen entstehen. Diese Enthalpie-Änderungen ΔH stehen mit der Bindungskonstante K_a (siehe auch Gleichung (4-2)) über folgende Gleichung im Zusammenhang [118]:

$$-R \cdot T \cdot \ln K = \Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (4-14)$$

R :	allgemeine Gaskonstante $\left[8,3144621 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right]$
T :	absolute Temperatur [K]
K :	Gleichgewichtskonstante
ΔG :	freie Reaktionsenthalpie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$
ΔH :	Reaktionsenthalpie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$
ΔS :	Entropie $\left[\frac{\text{J}}{\text{K}}\right]$

Für die Gleichgewichtskonstante wird die Bindungskonstante K_a als dimensionslose Konstante in der ITC eingesetzt. Durch die Messung der Enthalpieänderungen und abgeleitet davon durch Bestimmung der Entropie und Wärmekapazität können Bindungskonstante und Stöchiometrie der Bindung bestimmt werden [16, 118].

Das Kalorimeter besteht aus einer Referenz- und einer Reaktionszelle, die mit einer gleichen Pufferlösung befüllt werden. Beide Zellen werden beheizt, um eine konstante Temperatur einzustellen [118]. Das zu untersuchende Protein befindet sich in der Reaktionszelle, zu der schrittweise eine

gewisse Ligandenkonzentration zugefügt wird [15]. Durch Interaktion, also Ausbildung eines Komplexes, kommt es zu einer Wärmeaufnahme (endotherme Reaktion) oder Wärmeabgabe (exotherme Reaktion) in der Reaktionszelle [15, 16, 118]. Demzufolge muss die Heizleistung angepasst werden, um die Temperatur in der Reaktionszelle konstant zu halten [118].

Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass sie von der Molekülgröße unabhängig ist und Moleküle erfassen kann, die sich spektroskopischen Methoden entziehen [15]. Nachteile dieser Methode, besonders im Vergleich zur ACE, sind die relativ großen Mengen an Protein, die relativ lange Reaktions- und Äquilibrationszeit und die Notwendigkeit einer hochgereinigten Probenlösung [15].

5 Metallionen

Metallionen sind aus verschiedenen Gründen wichtige Interaktionspartner für Proteine. Einige der untersuchten Metallionen sind essentielle Spurenelemente, wie Kupfer, Mangan und Nickel [119]. Zum Teil sind sie auch Cofaktoren bei enzymatischen Reaktionen [120, 121]. Bei diesen sind häufig Zink, Magnesium, Nickel oder Mangan beteiligt [63]. Des Weiteren ist Eisen Bestandteil einer wichtigen prosthetischen Gruppe im Häm des Hämoglobins und des Myoglobins [63] (siehe auch Abschnitt 2.4.3). In diesen Molekülen ist das Metallion fest gebunden und steht nicht nur, wie bei Cosubstraten, reversibel mit dem Enzym in Interaktion [63]. Ein weiteres wichtiges Ion stellt das Calcium dar, das bei vielen Signalübertragungswegen als intrazellulärer Botenstoff (*second messenger*) genutzt wird [63].

Andere Metallionen, wie zum Beispiel Barium, sind toxisch oder können wie Nickel Allergien auslösen, wobei der Mechanismus der Nickelallergie noch nicht geklärt wurde [122, 123].

Des Weiteren können Metallionen auch zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Verzögerungsinsuline enthalten Zinkionen, welche Hexamerkomplexe ausbilden. Dadurch wird die Löslichkeit herabgesetzt und die so erhaltene Insulin-Suspension weist eine verringerte Resorptionsgeschwindigkeit auf [124]. Platinkomplexe werden als Zytostatika [125] und Goldverbindungen zur Behandlung rheumatoider Arthritis [126] eingesetzt.

Metallionen finden sich aber auch in Primärpackmitteln für biopharmazeutische Produkte, wodurch sich Instabilitäten (siehe Abschnitt 2.2.3) ergeben können. Einige Metallionen, wie Calcium, Magnesium oder Zink, werden zudem in biopharmazeutischen Produkten eingesetzt, um diese durch die Ausbildung einer starren, kompakteren Struktur zu stabilisieren [14]. Des Weiteren wurden Metallionen-Interaktionen auch bei einigen Krankheiten nachgewiesen. So stehen zum Beispiel Kupfer und Zink mit Krankheiten, wie Alzheimer [21, 121] oder Parkinson [21], in Verbindung aber auch bei der Entstehung einiger Krebsarten [120] sind diese beteiligt.

Je nach Protein und Metallion werden unterschiedliche Bindungsstellen gefunden. Häufig sind Histidine beteiligt [50], was in der Proteinaufbereitung durch Anhängen mehrerer Histidinreste, dem sogenannten *his-tag*, genutzt wird [127]. Des Weiteren werden zudem häufig Cystein, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und auch Phosphorylierungen neben einer Reihe weiterer möglicher Interaktionsstrukturen in Proteinen gefunden [14, 128, 129]. Viele Proteine weisen mehr als eine Bindungsstelle für Metallionen auf. Diese binden zum Teil unterschiedliche Metallionen mit verschiedener Präferenz und Stärke [130, 131]. Nicht nur die Bindungsaffinität von einem Protein kann unterschiedlich zu verschiedenen Metallionen ausgeprägt sein, es können sich auch durch verschiedene Metallionen signifikant unterschiedliche Konformationsänderungen eines Proteins ergeben [131].

Bei den durchgeführten Versuchen wurde bei fast allen Interaktionspaaren eine längere Migrationszeit des Proteins unter Metallionen-Einfluss detektiert. Diese Verringerung der Gesamtmobilität deutet auf eine Zunahme der negativen Gesamtladung der untersuchten Proteine hin, die alle bei einem pH-Wert von 7,4 eine negative Ladung aufweisen, da die untersuchten Proteine jeweils einen isoelektrischen Punkt kleiner als 7,4 haben (siehe Abschnitt 2.4).

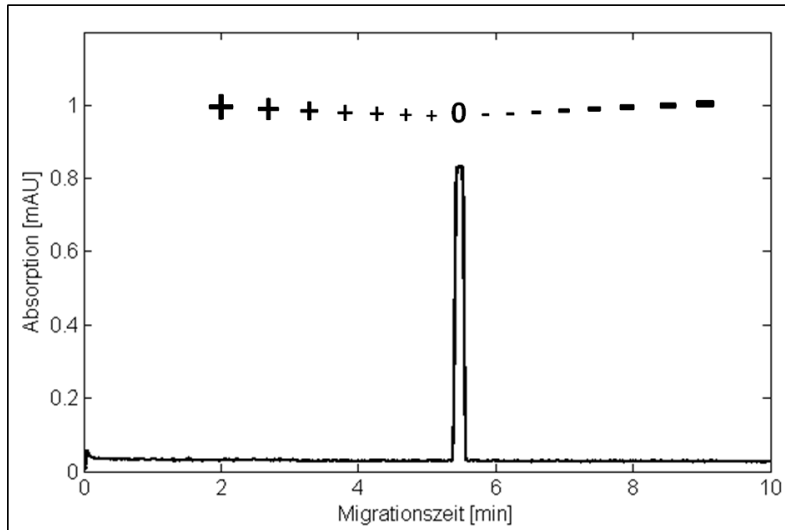


Abbildung 5-1: Elektropherogramm von Acetanilid als EOF-Marker und schematischer Darstellung der Ladungsverteilungen im Elektropherogramm.

Demzufolge führt eine Interaktion mit Metallionen nicht zu einer Verringerung der effektiven, nach außen erscheinenden, Gesamtladung der Proteine und folglich liegt keine einfache Bindung der Metallionen am Protein vor. Eine Komplexbildung der Metallionen mit weiteren Anionen aus der umgebenden Lösung ist somit wahrscheinlich. Häufig sind an Metallionenbindungen auch mehr als eine Aminosäure beteiligt. So findet man Interaktionen mit bis zu fünf Aminosäuren [128]. Eine mögliche Hypothese der Komplexbildung ist in Abbildung 5-2 dargestellt.

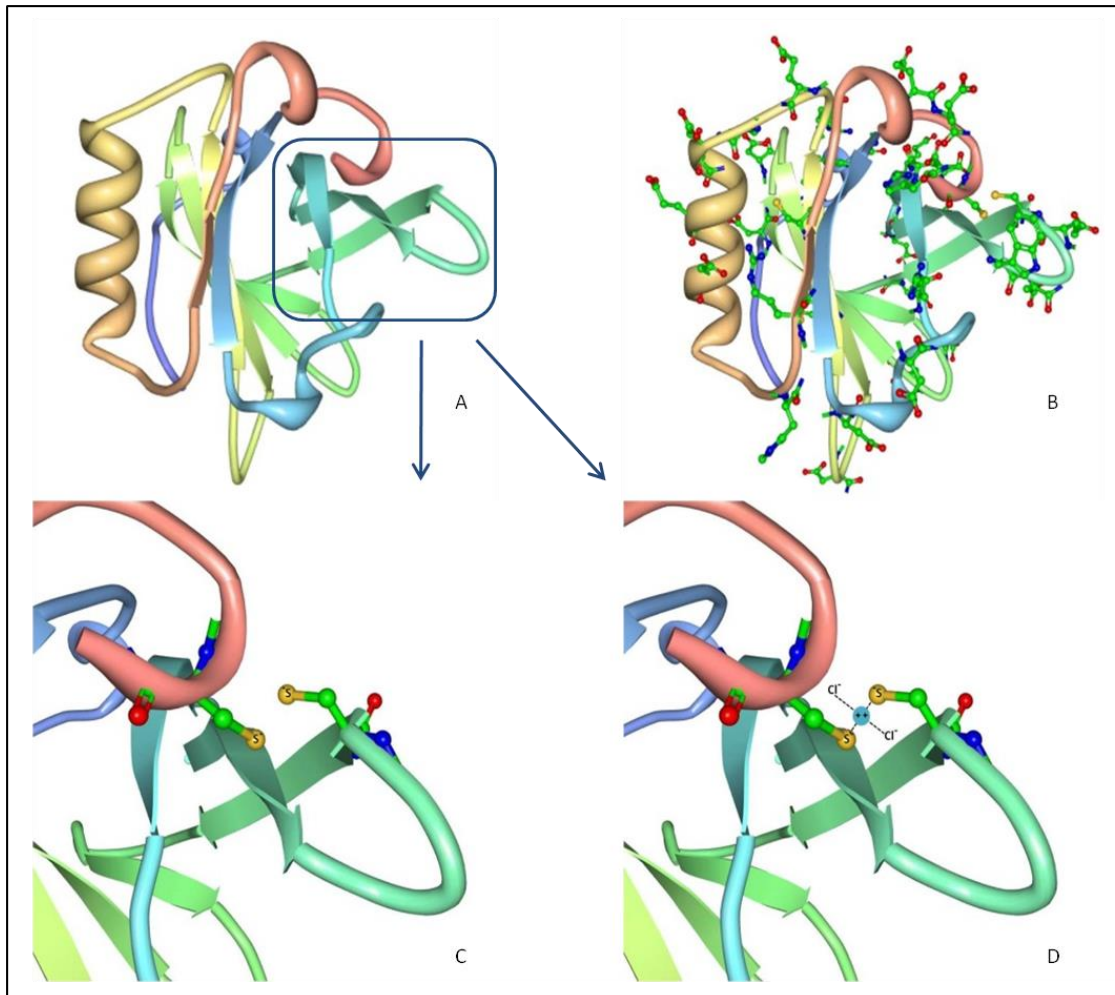


Abbildung 5-2: schematische Darstellung eines möglichen β-Lactoglobulin-Metallion-Komplexes mit weiteren Anionen aus der umgebenden Lösung

A: Proteinstruktur von β-Lactoglobulin (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 3NPO; [132])

B: hervorgehoben sind Aminosäuren (R, N, C, E, H, W), die mögliche Bindungsstellen für das Metallion darstellen

C: Vergrößerung der bereits deprotonierten Thiolgruppen der in Nähe zueinander gelegenen CYS66 und CYS160

D: nach der Bindung des Metallions kann dieses einen Komplex mit weiteren Anionen aus der umgebenden Lösung bilden

Diese Abbildung zeigt die Proteinstruktur des β-Lactoglobulins (Protein Data Bank ID (www.rcsb.org): 3NPO; [132]). Zwei Aminosäuren, CYS66 und CYS160, die sich in räumlicher Nähe befinden und eine Interaktion mit Metallionen eingehen können, sind im Teilbild C vergrößert dargestellt. Diese Aminosäuren können nach Deprotonierung der Thiolgruppen eine Bindung zum Metallion ausbilden. Die bis zu dieser Bindung erscheinende Gesamtladung des Proteins bleibt somit, sofern zwei Aminosäuren an der Komplexierung beteiligt sind, mit der des ungebundenen Proteins gleich. Eine solche Deprotonierung mit anschließender Interaktion zu einem Metallion wurde insbesondere für Cystein beschrieben [133]. In einem folgenden Schritt kann das Metallion einen Komplex zu weiteren Anionen, wie zum Beispiel den Chloridionen, aus der umgebenden Lösung ausbilden. Diese beschriebene Darstellung stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die negativere erscheinende effektive Gesamtladung des Proteins dar.

Eine ähnliche Veränderung der Mobilität durch den Einfluss von Metallionen wurde bei der Interaktion von Glutathion und Silber(I) beobachtet [134]. Glutathion ist ein Peptid, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht. Das Silberion wird bei der Interaktion stark an dem deprotonierten Thiolrest des Cysteins gebunden. Durch die Deprotonierung und anschließende Bindung des Silberions ändert sich bei neutralem pH-Wert die erscheinende Gesamtladung des Peptids nicht. Ebenfalls werden bei dieser Interaktion in einem darauffolgenden Reaktionsschritt weitere Anionen gebunden, so dass die effektive Gesamtladung negativer wird [134].

Aber nicht nur Komplexbildungen wurden durch Metallionen-Einfluss detektiert, zum Teil finden sich auch Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, sowie Aggregationen oder Protein-Metallion-Protein-Komplexe [135]. Eine Konformationsänderung wurde beispielsweise bei Calmodulin durch Calciumionen beschrieben [129]. Diese Veränderungen können sich im Elektropherogramm als Peakform-Änderungen bemerkbar machen [59, 136].

5.1 Getestete Metallionen

Untersucht wurden die Metallionen Barium, Calcium, Kupfer, Magnesium, Mangan und Nickel. Alle Metalle wurden als Chlorid-Salze eingesetzt, um ein vergleichbares Milieu bezüglich der Gegenionen und der Ionenstärke zu schaffen und zudem Interaktionen bezogen auf das Gegenion gering und vergleichbar zu halten. Die Versuche mit Zinkchlorid als Interaktionspartner konnten nicht ausgewertet werden, da die Elektropherogramme mit Zinkchlorid im Laufpuffer nur einen Acetanilid-Peak und keinen Protein-Peak aufwiesen. Selbst eine Verlängerung der Detektionszeit beim Zusatz des Zinkchlorids im Laufpuffer zeigte keinen Protein-Peak. Ähnliches wurde auch bei der Interaktion von Nickelchlorid und β -Lactoglobulin beobachtet. Nähere Erläuterungen zu diesen Beobachtungen finden sich im Abschnitt 5.3.

Die Versuche wurden mit BSA, β -Lactoglobulin und Ovalbumin durchgeführt.

5.2 Interaktionen mit BSA

Alle untersuchten Metallionen führten beim BSA zu einer Verlängerung der Migrationszeit und folglich einer geringeren effektiven elektrophoretischen Mobilität. Die erhaltenen $\Delta R/R_f$ -Werte weisen alle einen negativen Betrag auf. Die Interaktionen aller untersuchten BSA-Metallionen-Paare sind signifikante Interaktionen, wie durch die Konfidenzintervalle in Abbildung 5-3 gezeigt wird, da niemals die x-Achse von den erhaltenen Konfidenzintervallen geschnitten wird.

Das große Konfidenzintervall der BSA-Kupfer-Interaktion ist auf Kupferionen-Adsorption an der Kapillaroberfläche zurückzuführen und nicht auf eine große Streuung der Einzelmesswerte. Die Migrationszeiten von Acetanilid und BSA steigen bei Verwendung des Tris-Puffers mit 250 $\mu\text{mol/l}$ Kupferchlorid stetig an. Diese Erniedrigung der Mobilität und demzufolge des EOFs bedeutet, dass die Kapillaroberfläche durch adsorbierte Kupferionen positiver geworden ist. Diese Metallionen-Adsorptionen an der Kapillaroberfläche lassen sich auch zur gezielten Kontrolle des elektroosmotischen Flusses verwenden [137].

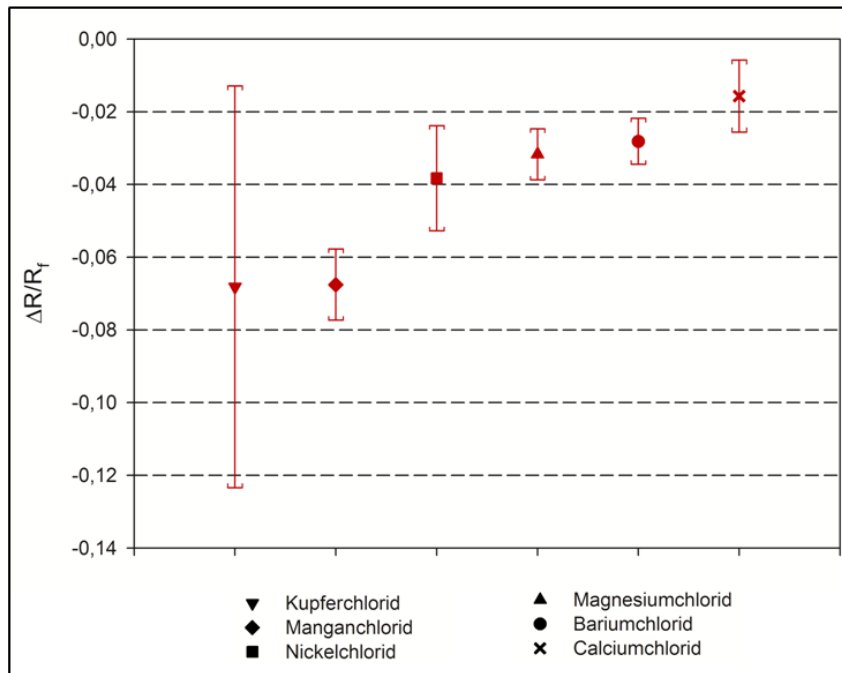


Abbildung 5-3: Metallionen-Einflüsse auf BSA. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Metallionenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Zum Teil werden durch Interaktion mit den Metallionen auch die Peakformen des BSA beeinflusst. Diese Veränderungen der Peakform sind stark vom jeweiligen Ion abhängig. So zeigt sich ein schmaler, aber höherer BSA-Peak unter Calciumchlorid-Einfluss und ein breiterer, aber niedrigerer BSA-Peak durch Kupferchlorid-Einfluss.

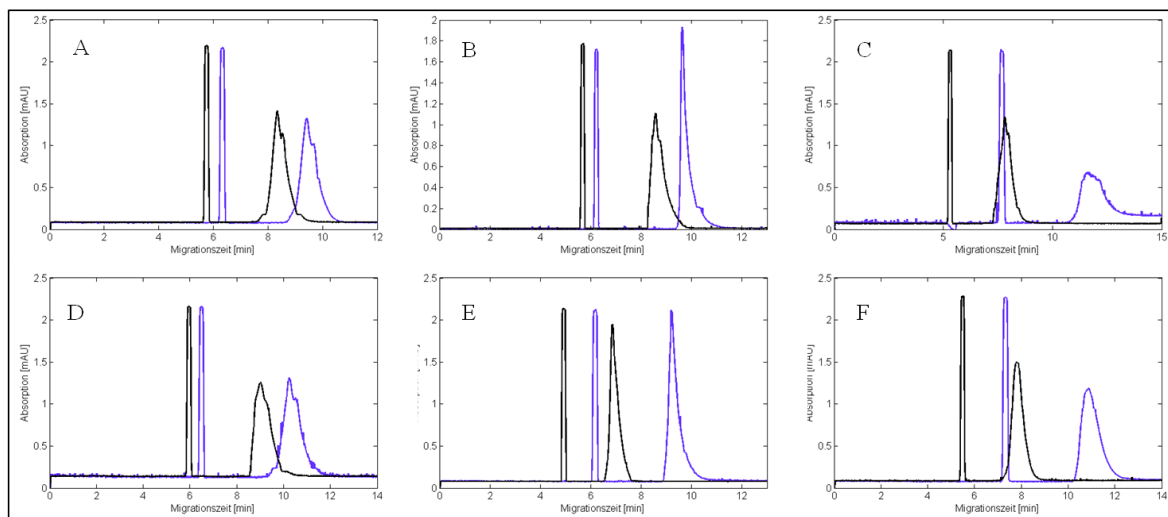


Abbildung 5-4: Elektropherogramme von Acetanilid und BSA. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 250 $\mu\text{mol/l}$ des entsprechenden Ions im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Bariumchlorid

B: Calciumchlorid

C: Kupferchlorid

D: Magnesiumchlorid

E: Manganchlorid

F: Nickelchlorid

5.3 Interaktionen mit β -Lactoglobulin

Der Einfluss auf β -Lactoglobulin wurde mit Bariumchlorid, Calciumchlorid, Kupferchlorid und Manganchlorid untersucht. Die Elektropherogramme unter Nickelchlorid zeigten selbst bei einer Detektionszeit von 30 Minuten keinen Protein-Peak, wie es schon bei der Interaktion der drei getesteten Proteine unter Zinkchloridzusatz beobachtet wurde. Unwahrscheinlich für diese Beobachtung scheint eine Proteinadsorption an der Kapillarwand zu sein, da die Elektropherogramme in purer Pufferlösung keine Änderungen der Protein-Peaks aufwiesen und direkt nach Änderung der Pufferlösung die Protein-Peaks nicht mehr detektiert werden konnten. Diese Beobachtungen schließen auch Metallionen-Adsorption an der Kapillarwand [137], zumindest als alleinige Ursache für die Nickelchlorid-Interaktionsuntersuchung, aus. Unter dem Einfluss von Nickelchlorid nahm, wie bereits bei der BSA-Kupferchlorid-Interaktion beschrieben, die Acetanilid-Mobilität stetig ab. Diese Veränderung des EOFs wurde allerdings nicht bei den Versuchen mit Zinkchlorid beobachtet. Folglich kommt eine Metallionen-Adsorption an der Kapillarwand nur für das Nickelchlorid als unterstützende Ursache in Betracht. Eine mögliche Ursache für eine so starke Mobilitätserniedrigung, eventuell mit Adsorptionseffekten an der Kapillarwand, könnte eine Komplexbildung von mehreren Proteinen und einem Metallion darstellen. Diese Komplexbildungen werden therapeutisch, wie zu Beginn des Kapitels erläutert, beim Insulin mit Zinkionen angewendet. Diese Komplexbildung erniedrigt die Mobilität durch die deutlich negativere effektive Gesamtladung und den größeren Radius stark. Ebenfalls werden wie beim BSA die Gesamtmobilitäten des β -LG durch den Metallionen-Einfluss verringert und alle Interaktionen, außer mit Bariumchlorid, weisen eine signifikante Interaktion auf.

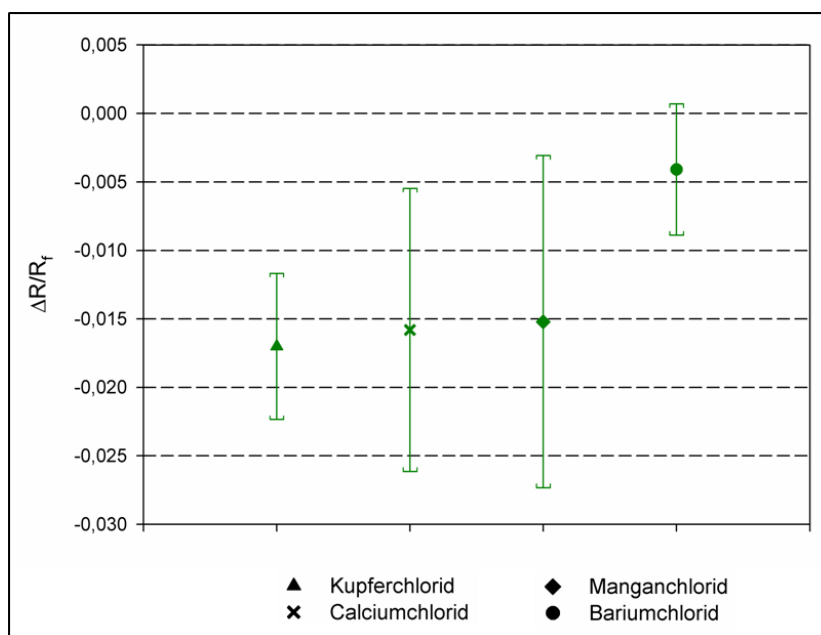


Abbildung 5-5: Metallionen-Einflüsse auf β -LG. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Metallionenkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Auffällig bei den Untersuchungen der Metallionen-Einflüsse auf β -Lactoglobulin war eine starke Peakformveränderung des Proteins. Für β -LG sind (wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben)

Konformationsänderungen sehr wahrscheinlich, die die veränderten Peak-Formen erklären können. Jedoch sind Protein-Metallion-Protein-Komplexe nicht ganz auszuschließen, da der β -Lactoglobulin-Peak bei einer Metallionenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ zum Teil sehr stark abgeflacht war. Dadurch konnte die Migrationszeit nicht eindeutig bestimmt werden. Aus diesem Grund wird der Metallionen-Einfluss auf das β -LG bei einer Metallionenkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrachtet. Dennoch haben die Elektropherogramme unter den getesteten Metallionen eine geringere Peakhöhe (Abbildung 5-6). Die Elektropherogramme von β -Lactoglobulin zeigen des Weiteren bei den Interaktionsuntersuchungen mit Calciumchlorid einen zusätzlichen kleinen Peak (siehe Abbildung 5-6 Teilabbildung B). Diese Unterschiede in den Elektropherogrammen stellen eine Probenheterogenität von Proteinen verschiedener Chargen dar.

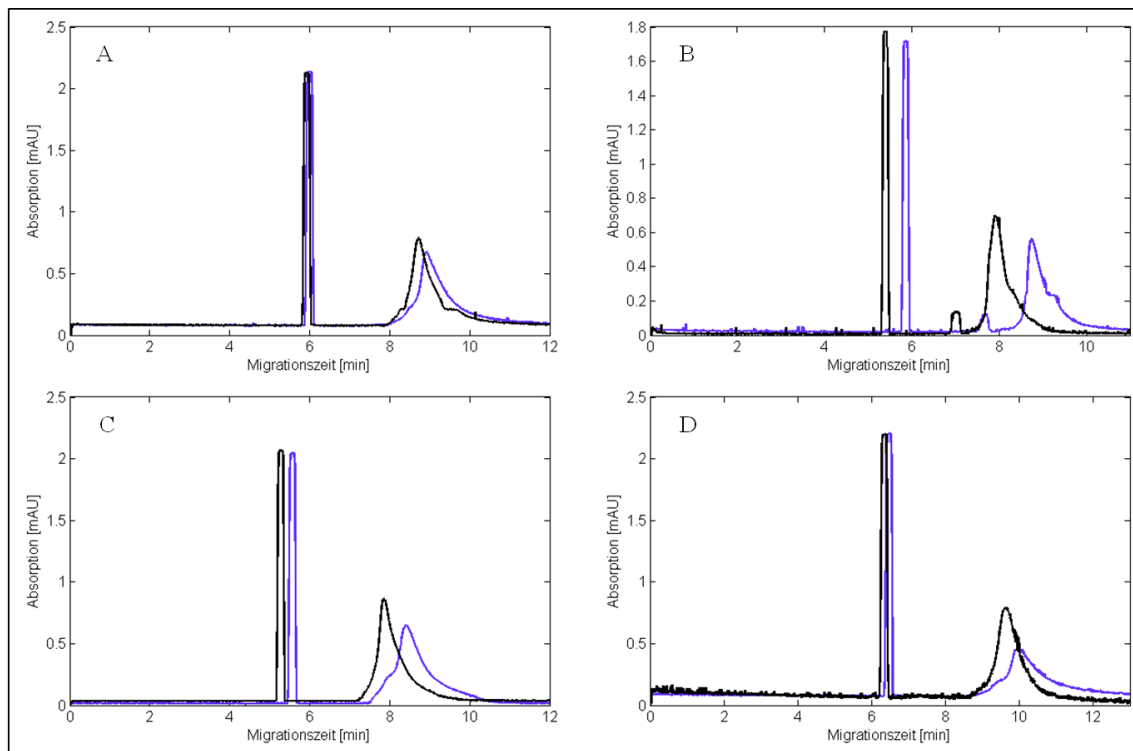


Abbildung 5-6: Elektropherogramme von Acetanilid und β -LG. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 100 $\mu\text{mol/l}$ des entsprechenden Ions im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Bariumchlorid

B: Calciumchlorid

C: Kupferchlorid

D: Manganchlorid

5.4 Interaktionen mit Ovalbumin

Interaktionen mit Ovalbumin wurden mit den Chloridsalzen von Barium, Calcium, Kupfer, Magnesium, Mangan und Nickel untersucht. Die Gesamtmobilität der erhaltenen Isoformen (siehe Abschnitt 2.4.4) verringerte sich durch den Einfluss der Metallionen. Ebenfalls verlängerten sich die Migrationszeiten der Ovalbumin-Isoformen durch Calciumchlorid-Einfluss, wenngleich diese Interaktionen positive $\Delta R/R_f$ -Werte haben (siehe Abbildung 5-7). Bei diesen Interaktionen wird die Notwendigkeit des EOF-Markers deutlich, da sich durch die Veränderung der Pufferzusammensetzung

(siehe Abschnitt 3.1.4 - 3.1.6) die Geschwindigkeit des EOFs verringert. Folglich weist Acetanilid auch eine längere Migrationszeit auf. Diese Mobilitätsveränderung des Acetanilids ist allerdings stärker als bei den Ovalbumin-Isoformen. Somit scheinen zwar die reinen Migrationszeiten der Isoformen verlängert, jedoch zeigt sich nach Bildung der Mobilitätsquotienten eine leichte Erhöhung der Mobilität. Dementsprechend ergeben sich die einzigen positiven $\Delta R/R_f$ -Werte der Ovalbumin-Metallionen-Interaktionen. Die Interaktion zwischen der ersten Ovalbumin-Isoform und Calciumchlorid ist nicht signifikant, wie das Konfidenzintervall aufzeigt.

In der Darstellung der Konfidenzintervalle (Abbildung 5-7) sieht man zudem, dass die Isoformen des Ovalbumins meist recht nahe beieinanderliegen und somit eine sehr ähnliche Beeinflussung durch das Metallion erfahren. Demzufolge scheinen die Phosphorylierungen der Ovalbumin-Isoformen die Interaktionen mit Metallionen nicht maßgeblich zu beeinflussen (vergleiche mit Abschnitt 9) und andere Bindungsstellen am Ovalbumin für die Mobilitätsveränderung verantwortlich zu sein. Diese ähnliche Beeinflussung der Isoformen ist besonders deutlich sichtbar in der Interaktion mit Mangan-, Magnesium- und Calciumchlorid. Die Versuche mit Nickelchlorid wurden mit einer anderen Charge Ovalbumin durchgeführt, wobei ebenfalls wie beim β -LG eine Probenheterogenität zu beobachten war. Diese zeigte sich im Elektropherogramm durch ein leicht verändertes Erscheinen der Isoform-Peaks, so dass nur die zweite und dritte Isoform mit den vorherigen Versuchen verglichen werden konnte (vergleiche Abbildung 5-8).

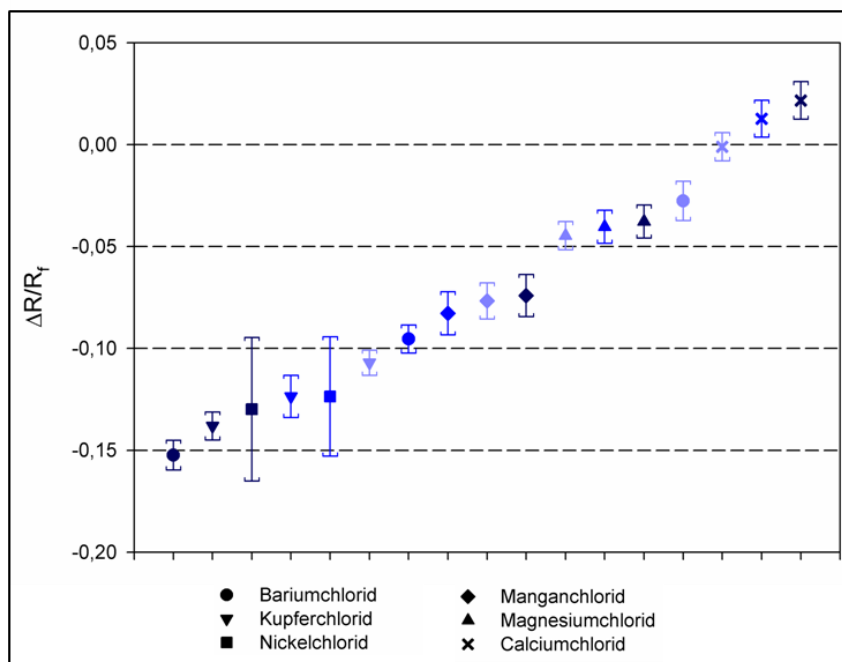


Abbildung 5-7: Metallionen-Einflüsse auf Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Metallionenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Der Einfluss der Metallionen auf die Peakform von Ovalbumin ist nicht so deutlich ausgeprägt wie bei BSA und β -LG. Eine Abnahme der Peakhöhe mit zeitgleicher Verbreiterung des Peaks zeigt sich

durch Kupfer- und Nickelchlorid. Die einzelnen Isoformen zeigten hierbei auch eine deutlichere Auftrennung.

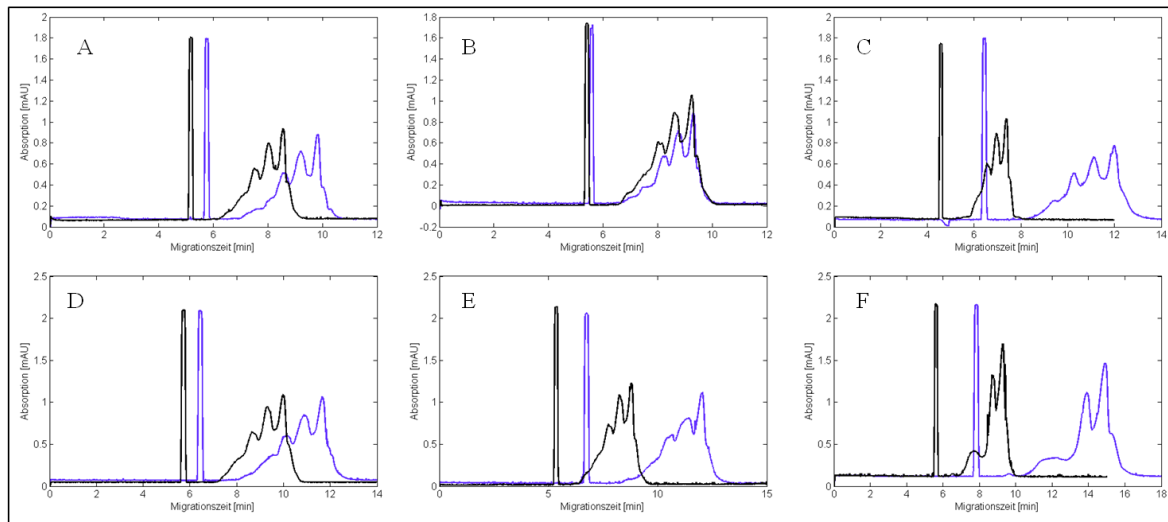


Abbildung 5-8: Elektropherogramme von Acetanilid und Ovalbumin. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 250 µmol/l des entsprechenden Ions im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Bariumchlorid

B: Calciumchlorid

C: Kupferchlorid

D: Magnesiumchlorid

E: Manganchlorid

F: Nickelchlorid

5.5 Präzision der Mobilitätsquotienten

Zur Beurteilung der Präzision werden die prozentualen relativen Standardabweichungen $RSD\%$ der Mobilitätsquotienten R_f und R_i betrachtet. Die Metallionen-Konzentration beim R_i -Wert entspricht der Konzentration, die bei den $\Delta R/R_f$ -Werten verwendet wurde. Somit liegt beim BSA und Ovalbumin eine Ligandenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ und bei β -Lactoglobulin von 100 $\mu\text{mol/l}$ vor.

Tabelle 5-1: prozentuale relative Standardabweichung der Mobilitätsquotienten R_f und R_i

Protein	Ligand	$RSD\%$ von den R_f -Werten	$RSD\%$ von den R_i -Werten
BSA	Bariumchlorid	0,41	0,52
	Calciumchlorid	0,43	1,02
	Kupferchlorid	5,40	2,98
	Magnesiumchlorid	0,67	0,39
	Manganchlorid	0,88	0,66
	Nickelchlorid	1,08	1,22
β -Lactoglobulin	Bariumchlorid	0,43	0,31
	Calciumchlorid	0,87	0,69
	Kupferchlorid	0,33	0,50
	Manganchlorid	1,09	0,78
Ovalbumin-Isoform 1	Bariumchlorid	0,47	0,98
	Calciumchlorid	0,53	0,55
	Kupferchlorid	0,30	0,68
	Magnesiumchlorid	0,42	0,67
	Manganchlorid	0,70	0,74
Ovalbumin-Isoform 2	Bariumchlorid	0,70	0,65
	Calciumchlorid	0,58	0,80
	Kupferchlorid	0,33	1,24
	Magnesiumchlorid	0,63	0,66
	Manganchlorid	0,83	0,89
	Nickelchlorid	0,58	3,61
Ovalbumin-Isoform 3	Bariumchlorid	0,77	0,77
	Calciumchlorid	0,61	0,79
	Kupferchlorid	0,24	0,83
	Magnesiumchlorid	0,84	0,30
	Manganchlorid	0,90	0,74
	Nickelchlorid	0,64	4,39

Tabelle 5-1 zeigt, dass von allen getesteten Interaktionspaaren die Mobilitätsquotienten zu 83% unter 1% relativer Standardabweichung und zu 93% unter 2% liegen.

5.6 Zusammenfassung

In der zusammenfassenden Darstellung der $\Delta R/R_f$ -Werte und der zugehörigen Konfidenzintervalle (Abbildung 5-9) ist eine Anordnung der Interaktions-Paare durch die Proteine sichtbar.

Die effektive elektrophoretische Mobilität der Ovalbumin-Isoformen ist mit Ausnahme der Calciumchlorid-Interaktion am Stärksten beeinflusst. Bei den relativ geringen Mobilitätsveränderungen und den daraus resultierenden $\Delta R/R_f$ -Werten des β -Lactoglobulins muss beachtet werden, dass hier eine geringere Metallionenkonzentration auf Grund der sehr starken Peakform-Veränderung des β -Lactoglobulins verwendet wurde. Diese Veränderung weist auf eine Konformationsänderung des β -Lactoglobulins hin. Die Interaktionen von Kupfer- und Nickelchlorid mit BSA zeigen eine schwächere Mobilitätserniedrigung durch Nickelchlorid, obwohl für beide Ionen die gleiche Bindungsstelle im BSA identifiziert wurde (ATCUN-Motiv; siehe Abschnitt 2.4.1). Dieser Unterschied könnte entweder auf weitere unterschiedliche Bindungen am BSA oder auf eine unterschiedliche Konformationsänderung durch die Interaktion zurückzuführen sein. Auffällig und abweichend von den anderen Interaktions-Paaren erscheint die Calciumchlorid-Ovalbumin-Interaktion. Eventuell steht dieser Unterschied im elektrophoretischen Verhalten des Ovalbumins mit der Botenstofffunktion des Calciums in Verbindung. Des Weiteren könnte dies eine Verbindung zur noch nicht geklärten Funktion dieses Proteins (siehe Abschnitt 2.4.4) sein. Bei einer Untersuchung zur Entstehung und Mineralisierung der Eierschale wurde zudem fürs Ovalbumin eine Interaktion mit bis zu 280 Calciumionen beschrieben [138]. Eine solche Interaktion des Ovalbumins mit zahlreichen Calciumionen würde die Ladung in den positiven Bereich verschieben und folglich die Mobilitätserhöhung erklären können.

Einige größere Konfidenzintervalle, wie zum Beispiel bei BSA-Kupferchlorid oder Ovalbumin-Nickelchlorid können auf eine stärkere Adsorption des Metallions an der Kapillarwand hindeuten. Metallionen adsorbieren mit unterschiedlicher Affinität an der Kapillaroberfläche, wodurch der elektroosmotische Fluss verringert wird [137]. Bei der sechsfachen Vermessung der verschiedenen Interaktionen adsorbieren einige Metallionen zunehmend an der Kapillaroberfläche und dementsprechend verringert sich der EOF stetig. Dies führt zu einer kontinuierlichen Zunahme der Migrationszeiten und bedingt dadurch größere Konfidenzintervalle.

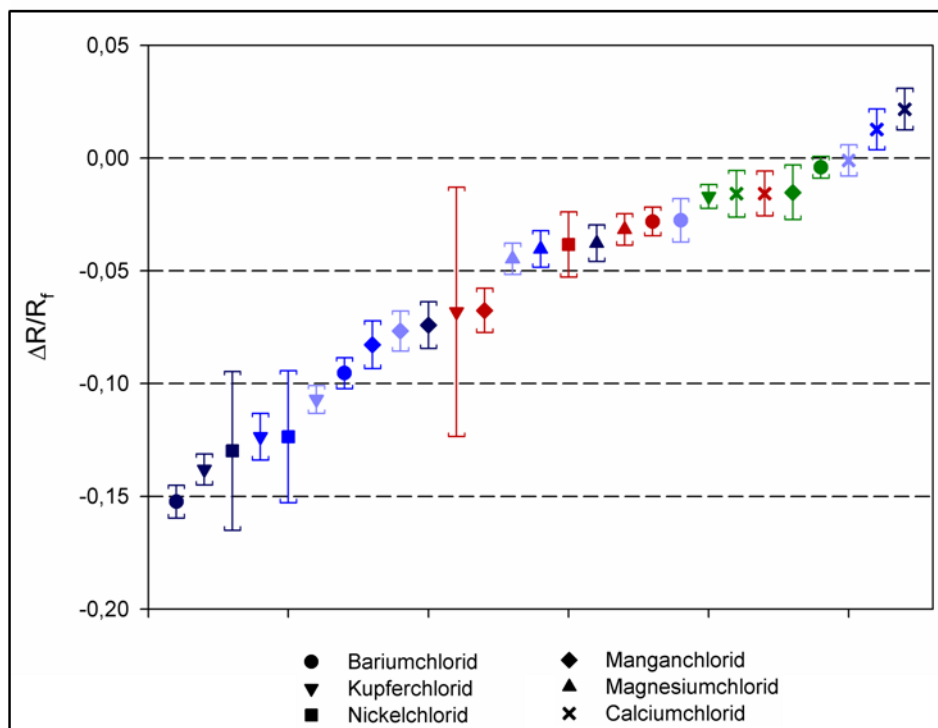


Abbildung 5-9: Metallionen-Einflüsse auf BSA (rot), β -LG (grün) und den Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Metallionenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ bei β -LG.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

6 Kationische Arzneistoffe

Der Einfluss von kationischen Molekülen und insbesondere von Arzneistoffen auf Proteine nimmt an Bedeutung zu. Durch eine Arzneistoffgabe können zum Beispiel Proteine aggregieren oder denaturieren. Aber auch der Arzneistoff selbst kann durch eine Proteinbindung beeinflusst werden. So kann die Pharmakokinetik, also der Einfluss des Organismus auf den Arzneistoff, und die Pharmakodynamik, der Einfluss des Arzneistoffs auf den Organismus, des Arzneistoffs verändert werden [15].

6.1 Getestete Arzneistoffe

Um den Einfluss von kationischen Molekülen auf die Proteine zu untersuchen, wurden als Modellarzneistoffe Ephedrinhydrochlorid, Ethambutoldihydrochlorid, Pilocarpinhydrochlorid und Pirenzepindihydrochlorid verwendet. Bei der Auswahl der Arzneistoffe wurde ebenfalls auf Chlorid als Gegenion geachtet.

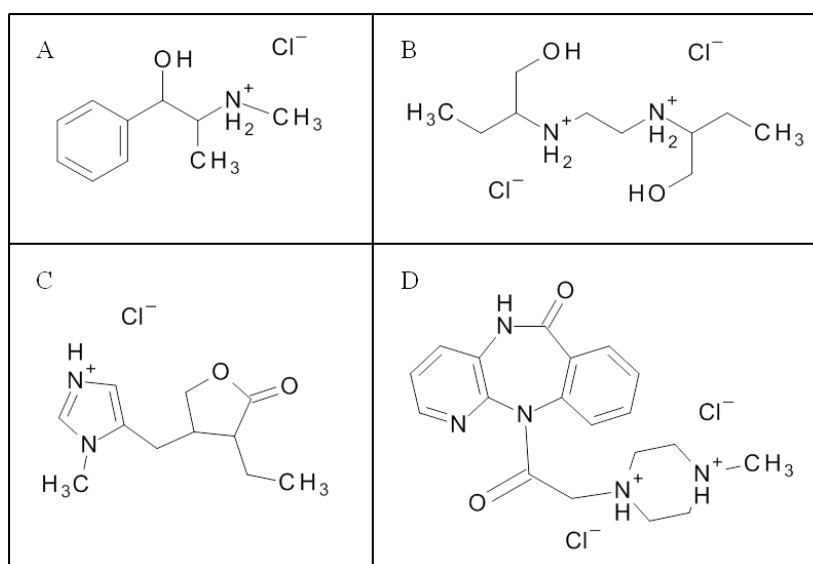


Abbildung 6-1: verwendete Arzneistoffe;

A: Ephedrinhydrochlorid

B: Ethambutoldihydrochlorid

C: Pilocarpinhydrochlorid

D: Pirenzepindihydrochlorid

Bei den im nachfolgenden beschriebenen durchgeführten Versuchen erhöhte sich zum Teil die effektive elektrophoretische Mobilität und somit ergab sich eine kürzere Migrationszeit, die sich in positiven $\Delta R/R_f$ -Werten niederschlägt. Demzufolge weisen die negativ geladenen Proteine eine verringerte effektive Gesamtladung durch Interaktion mit den kationischen Arzneistoffen auf. Fast die Hälfte der untersuchten und signifikanten Interaktions-Paare zeigte jedoch wieder eine Verringerung der Gesamtmobilität des jeweiligen Proteins. Diese Zunahme der effektiven negativen Gesamtladung des Proteins zeigt, dass hier wieder keine einfache Bindung am Protein vorliegt. Wahrscheinlich verdrängt ein Arzneistoffmolekül kleinere, am Protein angelagerte, Kationen, so dass die effektive Gesamtladung negativer wird.

6.2 Interaktionen mit BSA

Der Einfluss der vier getesteten Arzneistoffe auf BSA führt nicht immer zu einer Verringerung der effektiven elektrophoretischen Mobilität. Ephedrinhydrochlorid erhöht die effektive elektrophoretische Mobilität und zeigt demzufolge einen positiven $\Delta R/R_f$ -Wert. Die erhaltenen Konfidenzintervalle beweisen bei allen vier getesteten Arzneistoff-Interaktionen einen signifikanten Einfluss auf die BSA-Mobilität.

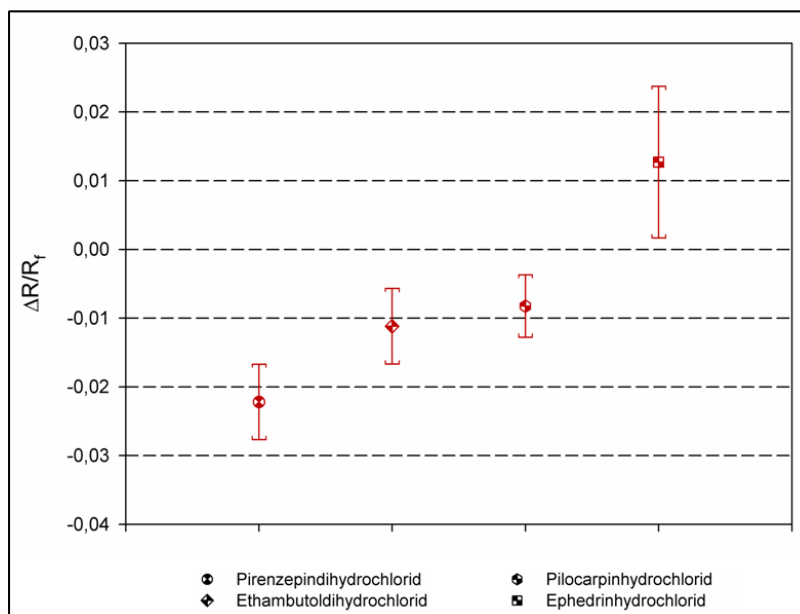


Abbildung 6-2: Einfluss der Arzneistoffe auf BSA. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Arzneistoffkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Auch durch den Arzneistoff-Einfluss werden zum Teil die Peakformen des BSA verändert. Am stärksten ist der Einfluss von Ethambutoldihydrochlorid zu sehen, wodurch der Peak an Höhe zunimmt und an Breite verliert. Einen gegenteiligen Einfluss hat Pirenzepindihydrochlorid auf den BSA-Peak, der durch die Interaktion eine geringere Peakhöhe und verbreiterte Peakform aufweist.

Die drei UV-absorbierenden Arzneistoffe, Ephedrinhydrochlorid, Pilocarpinhydrochlorid und Pirenzepindihydrochlorid, führen durch das Vorliegen im Laufpuffer zu einer hohen Hintergrundabsorption. Dadurch erscheint in den Elektropherogrammen ein negativer Peak, der der elektrophoretischen Mobilität des jeweiligen Arzneistoffs entspricht. Der negative Peak stellt folglich das Fehlen einer gewissen Arzneistoffkonzentration im Hintergrundsignal durch Interaktion mit dem BSA dar.

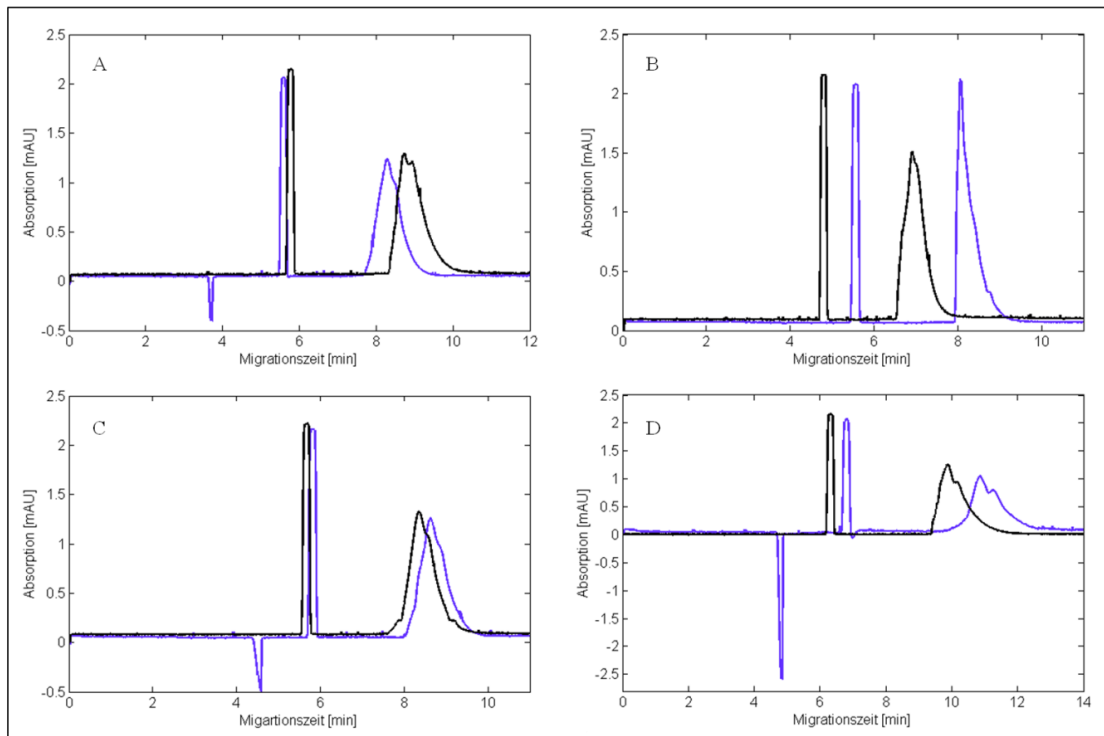


Abbildung 6-3: Elektropherogramme von Acetanilid und BSA. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 500 µmol/l des entsprechenden Arzneistoffs im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Ephedrinhydrochlorid

B: Ethambutoldihydrochlorid

C: Pilocarpinhydrochlorid

D: Pirenzepindihydrochlorid

6.3 Interaktionen mit β -Lactoglobulin

Der zu beobachtende Einfluss der Arzneistoffe auf β -LG ist bis auf Ethambutoldihydrochlorid signifikant. Wie aus der Abbildung 6-4 hervorgeht, sind die Auswirkungen auf die Gesamtmobilität recht unterschiedlich. Ethambutoldihydrochlorid und Pilocarpinhydrochlorid führen zu einer Verringerung der Gesamtmobilität und Pirenzepindihydrochlorid und Ephedrinhydrochlorid steigern diese.

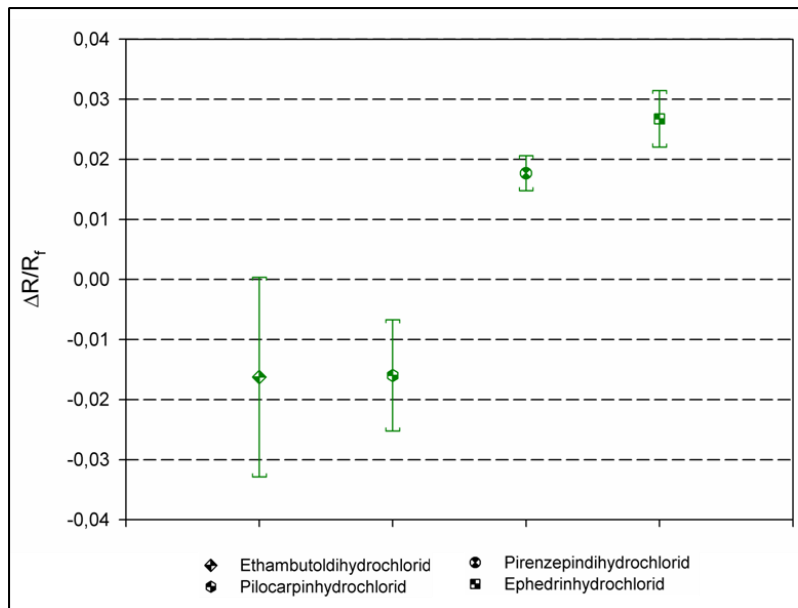


Abbildung 6-4: Einfluss der Arzneistoffe auf β -LG. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_0$ -Werte bei einer Arzneistoffkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_0$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_0$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Die Arzneistoffe beeinflussen die Peakform des β -Lactoglobulins nur unwesentlich, so dass hier durchgehend eine Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ Ligand verglichen werden kann.

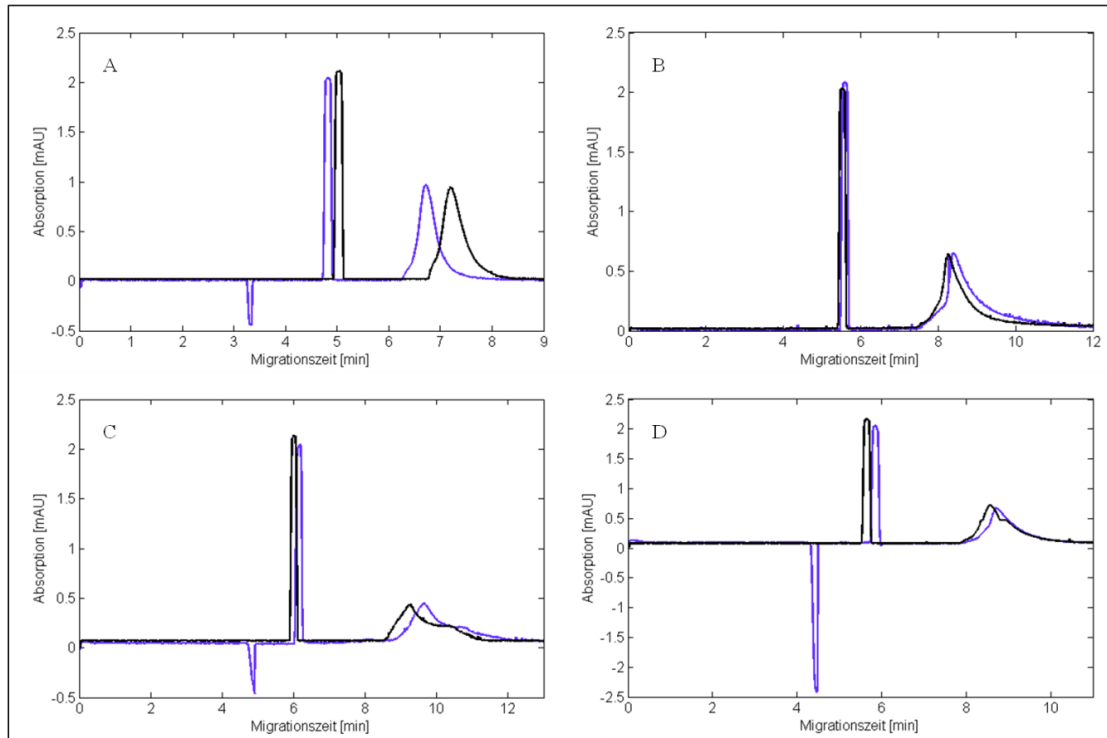


Abbildung 6-5: Elektropherogramme von Acetanilid und β -LG. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 500 $\mu\text{mol/l}$ des entsprechenden Arzneistoffs im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Ephedrinhydrochlorid

B: Ethambutoldihydrochlorid

C: Pilocarpinhydrochlorid

D: Pirenzepindihydrochlorid

6.4 Interaktionen mit Ovalbumin

Bei den Interaktionen der Arzneistoffe mit Ovalbumin zeigt sich sehr deutlich, dass die $\Delta R/R_f$ -Werte der drei Isoformen nahe zueinander angeordnet sind. Die Isoformen werden folglich sehr ähnlich durch den jeweiligen Liganden beeinflusst. Allein die Interaktion der zweiten Ovalbumin-Isoform und Pilocarpinhydrochlorid ist nicht signifikant. Die meisten Arzneistoffe erhöhen die Gesamtmobilität der Isoformen, so dass die Migrationszeit verkürzt wird. Einzig Ethambutoldihydrochlorid führt zu einer Verringerung der Mobilität.

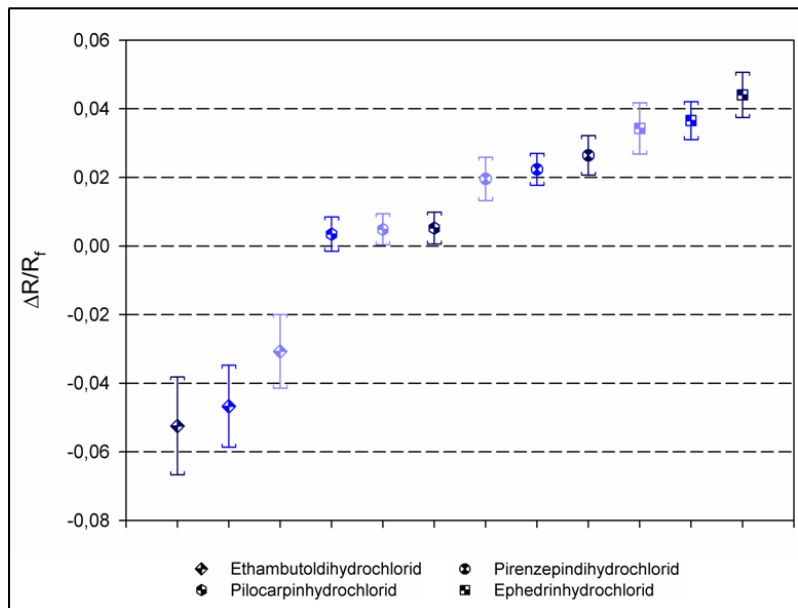


Abbildung 6-6: Einfluss der Arzneistoffe auf Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Arzneistoffkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Die Arzneistoffe führen zu keiner sichtbaren Veränderung der Peakform und Aufspaltung der Isoformen zueinander.

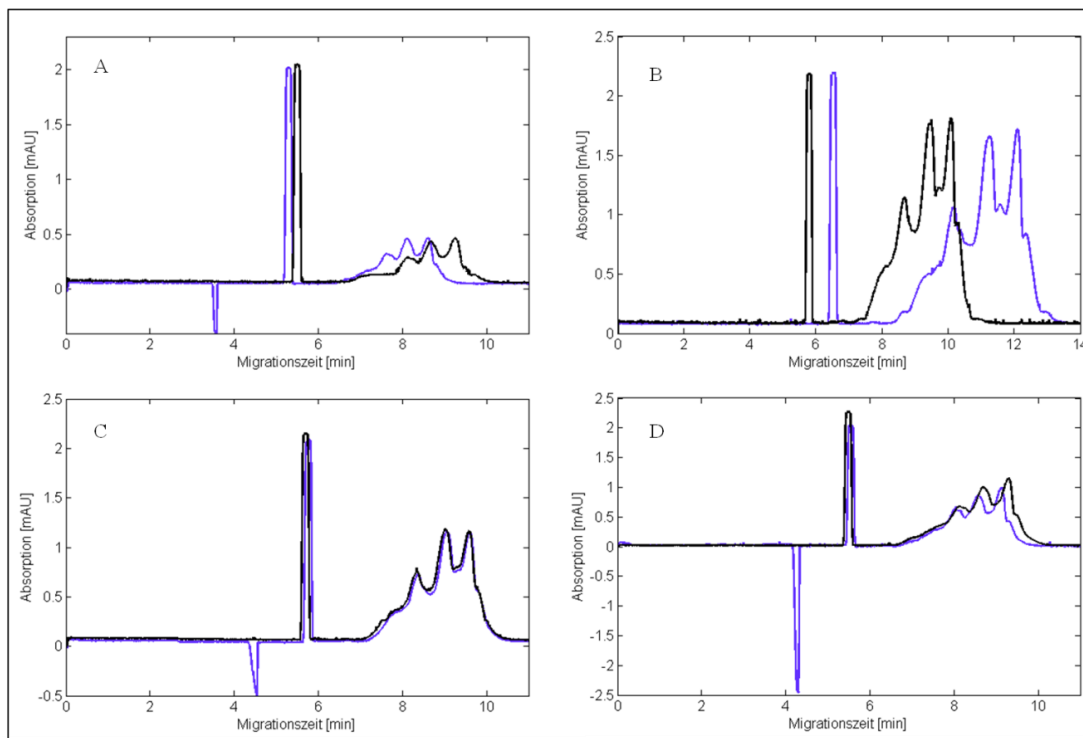


Abbildung 6-7: Elektropherogramme von Acetanilid und Ovalbumin. Das schwarze Elektropherogramm wurde mit Tris als Laufpuffer und das blaue Elektropherogramm mit 500 µmol/l des entsprechenden Arzneistoffs im Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchung mit

A: Ephedrinhydrochlorid

B: Ethambutoldihydrochlorid

C: Pilocarpinhydrochlorid

D: Pirenzepindihydrochlorid

6.5 Präzision der Mobilitätsquotienten

Die relativen Standardabweichungen der Mobilitätsquotienten der Arzneistoff-Protein-Interaktionen liegen zu 90% unter 1% und zu 98% unter 2%.

Tabelle 6-1: prozentuale relative Standardabweichung der Mobilitätsquotienten R_f und R_i

Protein	Ligand	RSD% von den R_f -Werten	RSD% von den R_i -Werten
BSA	Ephedrinhydrochlorid	0,83	0,88
	Ethambutoldihydrochlorid	0,55	0,26
	Pilocarpinhydrochlorid	0,33	0,38
	Pirenzepindihydrochlorid	0,09	0,62
β -Lactoglobulin	Ephedrinhydrochlorid	0,42	0,30
	Ethambutoldihydrochlorid	0,86	2,29
	Pilocarpinhydrochlorid	0,87	0,53
	Pirenzepindihydrochlorid	0,29	0,12
Ovalbumin-Isoform 1	Ephedrinhydrochlorid	0,51	0,62
	Ethambutoldihydrochlorid	1,05	0,56
	Pilocarpinhydrochlorid	0,35	0,35
	Pirenzepindihydrochlorid	0,30	0,61
Ovalbumin-Isoform 2	Ephedrinhydrochlorid	0,56	0,23
	Ethambutoldihydrochlorid	1,16	0,63
	Pilocarpinhydrochlorid	0,47	0,29
	Pirenzepindihydrochlorid	0,28	0,41
Ovalbumin-Isoform 3	Ephedrinhydrochlorid	0,61	0,38
	Ethambutoldihydrochlorid	1,40	0,75
	Pilocarpinhydrochlorid	0,42	0,29
	Pirenzepindihydrochlorid	0,43	0,46

6.6 Zusammenfassung

Die zusammenfassende Abbildung 6-8 zeigt sehr deutlich, dass durch die Arzneistoff-Interaktionen keine klare Gruppierung der Proteine zu sehen ist, wie sie bei der Interaktion mit den Metallionen (siehe Abschnitt 5.6) zu beobachten war. Vielmehr sieht man eine leichte Einteilung durch die Arzneistoffe. Des Weiteren zeigt die Abbildung, dass Ethambutoldihydrochlorid bei allen drei Proteinen zu einer Verringerung der Gesamtmobilität, Ephedrinhydrochlorid aber zu einer Erhöhung führt. Bei den anderen beiden Arzneistoffen werden nicht alle Proteine in der Veränderung der Gesamtmobilität gleich beeinflusst. So zeigen Ovalbumin und β -LG eine Erhöhung der Mobilität durch Pirenzepindihydrochlorid, wohingegen die Gesamtmobilität des BSA am stärksten durch diesen Arzneistoff verringert wird. Bei Pilocarpinhydrochlorid verringern sich die Mobilitäten von BSA und β -LG, dagegen erhöht sie sich bei den Ovalbumin-Isoformen.

7 Anionen

Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 erläutert, weisen verschiedene Zusätze wie Aminosäuren und andere Ionen zum Teil starke Interaktionen mit Proteinen auf. Anionische Moleküle und ihre Auswirkungen auf Proteine werden häufig mit der sogenannten Hofmeister-Serie in Verbindung gebracht [34, 35]. Diese Serie gibt eine Reihenfolge der Ionen nach ihren chaotropen beziehungsweise kosmotropen Eigenschaften an (siehe Abschnitt 2.2.3).

7.1 Getestete Anionen

Unterschiedliche Liganden, die bei pH 7,4 anionisch vorliegen, wurden von Frau Dr. Yuanhong Xu im Rahmen ihres Post-Doktoranden-Aufenthaltes mit der Affinitätskapillarelektrophorese untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche mit der *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese werden in diesem Kapitel kurz präsentiert, um einen umfassenden Eindruck der Proteininteraktionen, detektiert mit ACE, zu erhalten.

Zu Beginn wurden Bernsteinsäure und Glutaminsäure in einem Phosphatpuffer pH 7,4 in ihrem Einfluss auf BSA, β -Lactoglobulin und Ovalbumin untersucht. In weiteren Versuchen wurden die Einflüsse von Acetylsalicylsäure, Bernsteinsäure, Dinatriumhydrogenphosphat, Glutaminsäure, Ibuprofen, Kaliumiodid, Kaliumthiocyanat, Natriumacetat, Natriumnitrat und Salicylsäure in Tris-Puffer pH 7,4 auf BSA, β -Lactoglobulin, Myoglobin und Ovalbumin getestet.

7.2 Besonderheit von Phosphationen

Phosphationen sind an einigen biologischen Prozessen beteiligt, so finden sich zum Beispiel Phosphorylierungen als posttranslationale Modifikationen (siehe Abschnitt 2.2.4) [41] oder bei der Aktivierung von Proteinkinasen (siehe Abschnitt 2.4.5). Viele Proteine weisen Interaktionen mit Phosphationen auf, wobei bislang nur wenige Bindungsstellen charakterisiert wurden [139, 140].

Die in den folgenden Abschnitten erläuterten Ergebnisse zeigten in einem Phosphat-Puffer pH 7,4 eine geringe Interaktion der Bernsteinsäure und der Glutaminsäure mit den Proteinen BSA, β -Lactoglobulin und Ovalbumin. Deshalb wurde der Einfluss von Phosphationen auf diese Proteine untersucht und nachfolgend ein Tris-Puffer für die weiteren Interaktionsuntersuchungen verwendet. Zur Untersuchung der Phosphationen-Interaktionen wurde Dinatriumhydrogenphosphat eingesetzt. Die Phosphorsäure besitzt drei pK_S -Werte, $pK_{S1}=1,96$, $pK_{S2}=7,21$ und $pK_{S3}=12,32$ [141], von denen der $pK_{S2}=7,21$ nahe dem verwendeten pH-Wert ist. Somit liegt bei dem verwendeten pH-Wert von 7,4 ein Gleichgewicht von Mono- und Dihydrogenphosphat vor.

7.3 Interaktionen mit BSA

Die untersuchten Liganden zeigen mit BSA unterschiedliche Auswirkungen in der Interaktion. So finden sich Migrationszeitenverkürzungen, also eine Erniedrigung der effektiven elektrophoretischen Mobilität, bei Ibuprofen, Kaliumthiocyanat, Glutaminsäure im Phosphat-Puffer, Salicylsäure und Acetylsalicylsäure, wobei diese Interaktion nicht signifikant ist. Eine Erhöhung der effektiven elektrophoretischen Mobilität wird durch Bernsteinsäure im Phosphat-Puffer, Natriumnitrat, Kaliumiodid, Bernsteinsäure im Tris-Puffer, Natriumacetat, Glutaminsäure im Tris-Puffer und

Dinatriumhydrogenphosphat hervorgerufen. Die Interaktionen mit Kaliumiodid und Natriumacetat zeigen ebenfalls keine Signifikanz auf.

Wie aus der Abbildung 7-1 ersichtlich wird, erhöht Dinatriumhydrogenphosphat die BSA-Mobilität am stärksten. Der Einfluss auf die effektive elektrophoretische Mobilität von BSA ist durch Interaktion mit Bernsteinsäure und Glutaminsäure im Phosphat-Puffer geringer ausgeprägt als im Tris-Puffer. Die Glutaminsäure im Phosphat-Puffer bewirkt allerdings einen entgegengesetzten Einfluss auf die Mobilität verglichen zur Interaktion im Tris-Puffer.

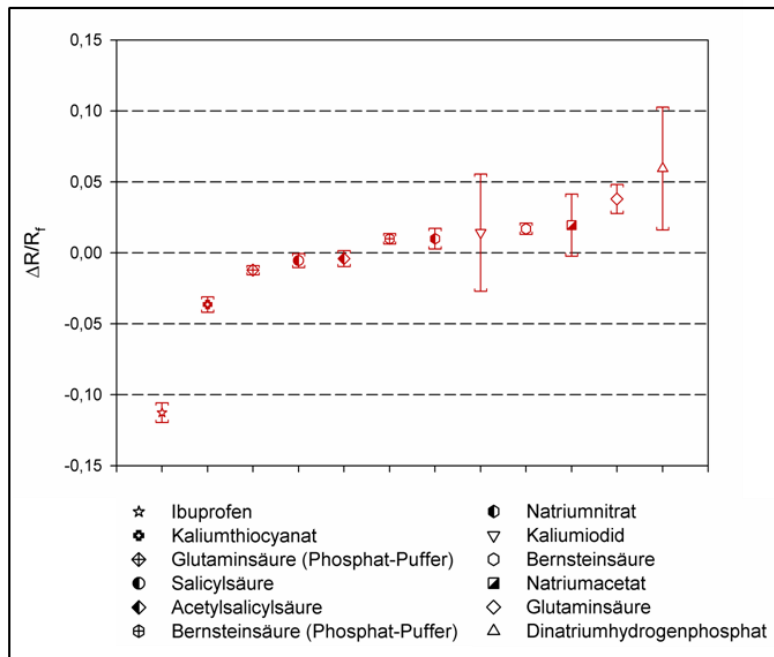


Abbildung 7-1: Einfluss der Anionen auf BSA. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_i$ -Werte bei einer Ligandenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_i$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_i$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

7.4 Interaktionen mit β -Lactoglobulin

Die Interaktionen mit den getesteten Anionen beeinflussen ebenfalls stark die Peak-Form des β -Lactoglobulins, wie bereits in Abschnitt 5.3 beobachtet. Deswegen wird eine Ligandenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ für die Interaktionen mit dem β -Lactoglobulin zur Auswertung betrachtet.

Die Interaktionen mit β -Lactoglobulin sind anders ausgeprägt als beim BSA. So führen Bernsteinsäure im Tris-Puffer, Natriumacetat, Glutaminsäure im Tris-Puffer, Salicylsäure, Ibuprofen, Bernsteinsäure im Phosphat-Puffer und Kaliumthiocyanat zu einer Verringerung der Gesamtmobilität (Abbildung 7-2). Diese wird durch Natriumnitrat kaum beeinflusst und zeigt sich zudem in einer nicht signifikanten Interaktion. Eine Erhöhung der Mobilität resultiert aus dem Einfluss von Glutaminsäure im Phosphat-Puffer, Acetylsalicylsäure, Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumiodid. Auffällig ist, dass vier Interaktionen keine Signifikanz aufweisen, nämlich Kaliumthiocyanat, Natriumnitrat, Acetylsalicylsäure und Kaliumiodid. Der Einfluss des Dinatriumhydrogenphosphates führt ebenfalls wie beim BSA zu einer starken Erhöhung der Mobilität. Eine Erniedrigung der effektiven

elektrophoretischen Mobilität bewirken Bernstein- und Glutaminsäure im Phosphat- und Tris-Puffer, wobei diese deutlicher im Tris-Puffer ausgeprägt ist.

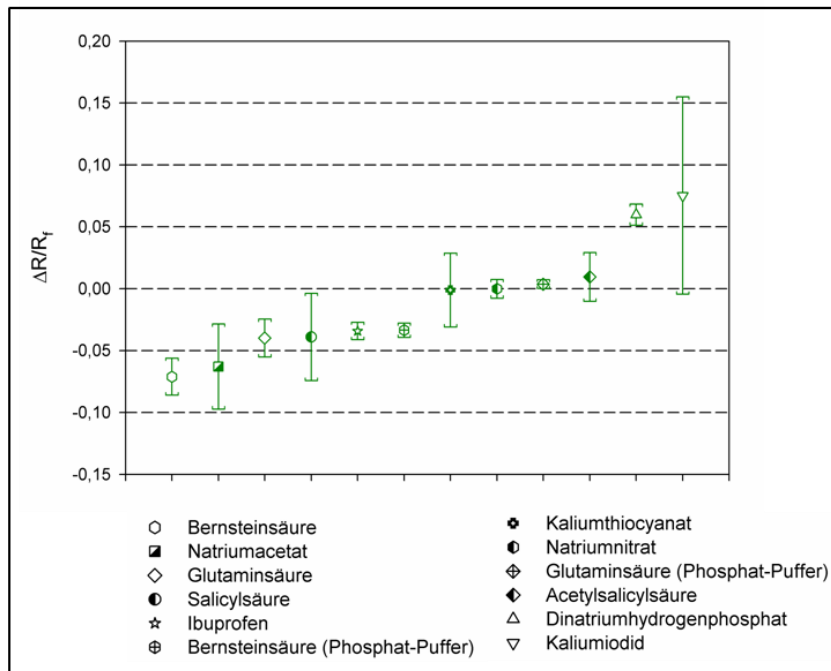


Abbildung 7-2: Einfluss der Anionen auf β -LG. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Ligandenkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

7.5 Interaktionen mit Myoglobin

Das fast neutral vorliegende Myoglobin zeigt eine verringerte effektive elektrophoretische Mobilität durch annähernd alle getesteten Liganden, außer Kaliumiodid, Kaliumthiocyanat und Dinatriumhydrogenphosphat, wobei nur das letztgenannte Interaktionspaar eine signifikante Veränderung darstellt.

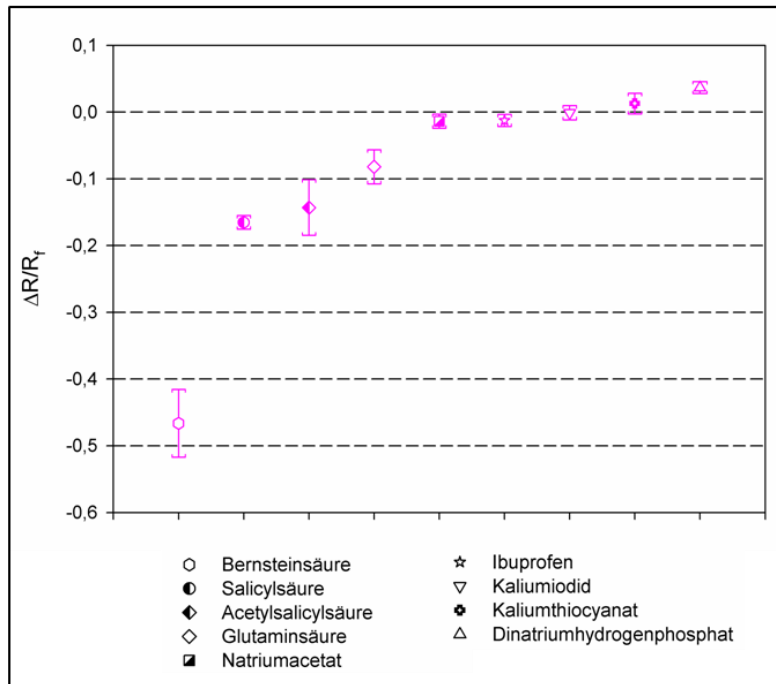


Abbildung 7-3: Einfluss der Anionen auf Myoglobin. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_T$ -Werte bei einer Ligandenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$.

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_T$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_T$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

7.6 Interaktionen mit Ovalbumin

Bei fast allen Liganden-Einflüssen werden die Ovalbumin-Isoformen, wie bei den anderen getesteten Liganden auch, in einem ähnlichen Ausmaß beeinflusst. Allein der Einfluss von Natriumacetat zeigt eine größere Spanne der $\Delta R/R_T$ -Werte der Isoformen.

Die Gesamtmobilität verringert sich durch Kaliumiodid, Glutaminsäure im Tris-Puffer, Kaliumthiocyanat, Bernsteinsäure im Phosphat-Puffer und Glutaminsäure im Phosphat-Puffer. Die Interaktionen zwischen einigen Isoformen und Kaliumiodid, Bernsteinsäure im Phosphat-Puffer, Kaliumthiocyanat, Ibuprofen und Bernsteinsäure im Tris-Puffer sind nicht signifikant. Nur bei Glutaminsäure im Phosphat-Puffer und Acetylsalicylsäure weisen alle drei Isoformen keine signifikante Interaktion auf. Eine Erhöhung der Gesamtmobilität der Ovalbumin-Isoformen durch das Dinatriumhydrogenphosphat ist nicht so stark ausgeprägt, wie durch Natriumacetat und Salicylsäure.

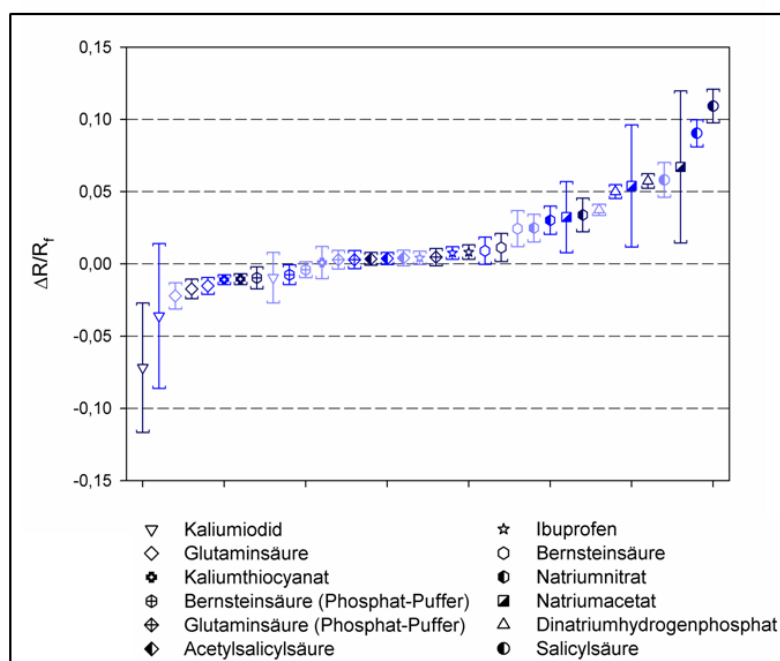


Abbildung 7-4: Einfluss der Anionen auf Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_i$ -Werte bei einer Ligandenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_i$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_i$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

7.7 Präzision der Mobilitätsquotienten

Eine Zusammenfassung der prozentualen relativen Standardabweichung der Mobilitätsquotienten ergibt für 75% eine $RSD\%$ von kleiner 1 und bei 87% kleiner 2.

Tabelle 7-1: prozentuale relative Standardabweichung der Mobilitätsquotienten R_f und R_i

Protein	Ligand	$RSD\%$ von den R_f -Werten	$RSD\%$ von den R_i -Werten
BSA	Acetylsalicylsäure	0,50	0,24
	Bernsteinsäure (Phosphat-Puffer)	0,13	0,37
	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	0,19	0,38
	Dinatriumhydrogenphosphat	4,71	0,70
	Glutaminsäure (Phosphat-Puffer)	0,17	0,30
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	0,89	0,67
	Ibuprofen	0,49	0,58
	Kaliumiodid	2,52	2,07
	Kaliumthiocyanat	0,26	0,45
	Natriumacetat	2,30	0,71
	Natriumnitrat	0,47	0,57
	Salicylsäure	0,51	0,19

β-Lactoglobulin	Acetylsalicylsäure	0,94	1,10
	Bernsteinsäure (Phosphat-Puffer)	0,44	0,42
	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	1,58	1,68
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,39	0,77
	Glutaminsäure (Phosphat-Puffer)	0,13	0,36
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	1,13	1,30
	Ibuprofen	0,44	0,37
	Kaliumiodid	7,63	1,87
	Kaliumthiocyanat	2,07	1,82
	Natriumacetat	0,69	3,97
	Natriumnitrat	0,31	0,77
	Salicylsäure	2,36	3,20
Myoglobin	Acetylsalicylsäure	0,67	4,65
	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	1,44	10,09
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,84	0,46
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	0,83	2,28
	Ibuprofen	0,47	0,78
	Kaliumiodid	0,94	0,71
	Kaliumthiocyanat	1,59	0,61
	Natriumacetat	0,28	1,13
	Salicylsäure	0,48	1,23
Ovalbumin-Isoform 1	Acetylsalicylsäure	0,43	0,30
	Bernsteinsäure (Phosphat-Puffer)	0,17	0,58
	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	0,70	1,04
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,34	0,26
	Glutaminsäure (Phosphat-Puffer)	0,59	0,39
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	0,50	0,81
	Ibuprofen	0,33	0,31
	Kaliumiodid	1,41	0,74
	Kaliumthiocyanat	0,27	1,20
	Natriumacetat	1,88	1,88
	Natriumnitrat	0,95	0,44
	Salicylsäure	0,94	0,88
Ovalbumin-Isoform 2	Acetylsalicylsäure	0,39	0,14
	Bernsteinsäure (Phosphat-Puffer)	0,34	0,67
	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	0,81	0,17
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,47	0,24
	Glutaminsäure (Phosphat-Puffer)	0,60	0,33
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	0,31	0,57
	Ibuprofen	0,28	0,32
	Kaliumiodid	2,13	3,33
	Kaliumthiocyanat	0,33	0,18
	Natriumacetat	4,63	0,37
	Natriumnitrat	0,92	0,54
	Salicylsäure	0,49	0,83
	Acetylsalicylsäure	0,41	0,13
Ovalbumin-Isoform 3	Bernsteinsäure (Phosphat-Puffer)	0,32	0,77

Ovalbumin-Isoform 3	Bernsteinsäure (Tris-Puffer)	0,78	0,42
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,46	0,29
	Glutaminsäure (Phosphat-Puffer)	0,59	0,29
	Glutaminsäure (Tris-Puffer)	0,28	0,70
	Ibuprofen	0,35	0,34
	Kaliumiodid	2,63	2,77
	Kaliumthiocyanat	0,37	0,16
	Natriumacetat	5,77	0,37
	Natriumnitrat	1,19	0,47
	Salicylsäure	0,67	0,98

7.8 Zusammenfassung

Die zusammenfassende Darstellung der $\Delta R/R_f$ -Werte mit den entsprechenden Konfidenzintervallen (Abbildung 7-5) zeigt weder eine Einteilung durch die Proteine, noch durch die Liganden. Demzufolge zeigt sich in diesen Interaktionen deutlich ein individuelles Zusammenspiel der getesteten Liganden mit den Proteinen. Der Einfluss des Dinatriumhydrogenphosphates ist bei fast allen Proteinen sehr stark ausgeprägt, wohingegen die Einflüsse der Bernstein- und Glutaminsäure im Phosphat-Puffer im Vergleich zum Tris-Puffer nur einen geringen Einfluss auf die effektive elektrophoretische Mobilität erbrachten. Dies könnte auf eine vorangegangene Interaktion des jeweiligen Proteins im Phosphat-Puffer mit Dihydrogenphosphationen hindeuten. Somit steht diese Phosphationen-Interaktion in Konkurrenz mit der, erst in der Kapillare auf das Protein treffenden, Bernstein- beziehungsweise Glutaminsäure, so dass diese Interaktion ein geringeres Ausmaß im Phosphat-Puffer zeigt.

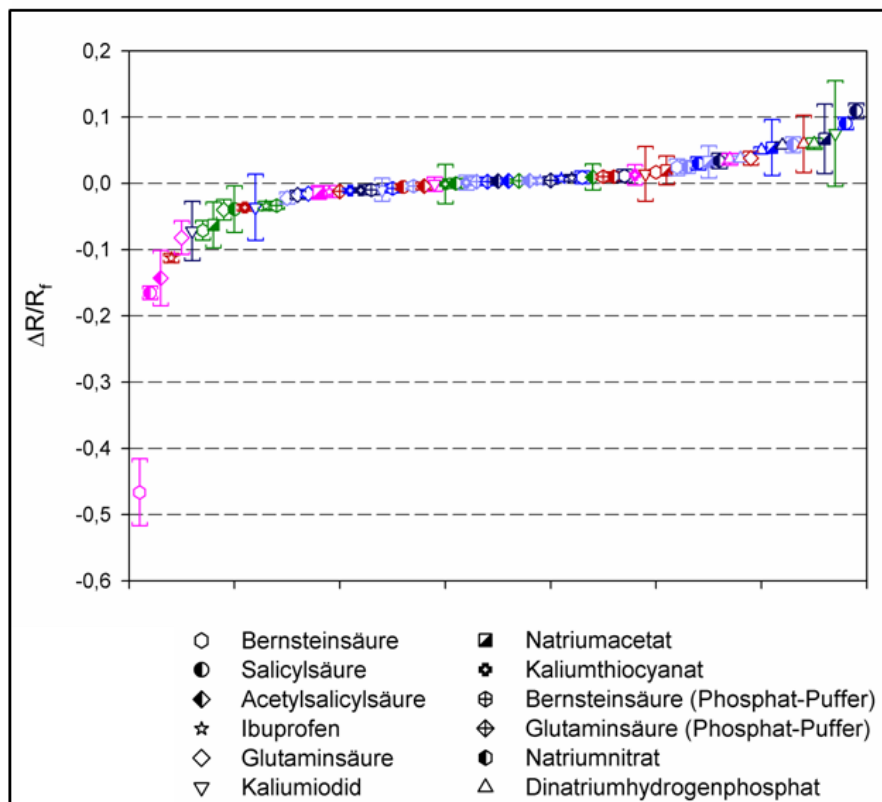


Abbildung 7-5: Einfluss der Anionen auf BSA (rot), β -LG (grün), Myoglobin (magenta) und den Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Ligandenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$ bei β -LG. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

8 Arginin und Guanidin

Arginin, Guanidin und Harnstoff sind Zusätze, die die Proteinstabilität und –aggregation beeinflussen [10, 142, 143]. Eine grobe Einteilung von Proteinzusätzen erfolgt meist in denaturierende und stabilisierende Zusätze, wobei Guanidin und Harnstoff zur ersteren Gruppe zählen (siehe auch Abschnitt 2.3) [10]. Arginin kann in keine der beiden Gruppen eingeordnet werden. Allerdings vermag Arginin Proteinaggregationen zu verhindern [10, 142]. Diese werden zum Teil auch durch das Guanidin, das eine Partialstruktur des Arginins darstellt, unterbunden. Jedoch wird hierbei eine nicht denaturierende Guanidinkonzentration verwendet. Guanidin soll dabei Zwischenstrukturen bei der Proteinrückfaltung durch Aggregationsprävention verhindern [10].

Eine Verhinderung von Zwischenstrukturen wurde auch für das Arginin beschrieben. So wurden Zwischenstrukturen des BSA bei einer konzentrationsabhängigen Entfaltung und Denaturierung durch Harnstoff beobachtet [142, 144]. Die denaturierende Wirkung des Harnstoffs zeigt bei BSA zwei verschiedene Entfaltungszustände in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration [144]. Durch die Zugabe von Arginin wird die Entstehung eines Entfaltungszustands bei einer geringen Harnstoffkonzentration verlangsamt. Bei einer höheren Harnstoffkonzentration zeigt sich weiterhin ein Entfaltungsprozess, der zur kompletten Entfaltung des BSA führt [142].

Die denaturierende Eigenschaft des Harnstoffs beruht auf noch nicht geklärten Mechanismen. Zum Teil wurden strukturbildende, aber auch strukturbrechende Eigenschaften (siehe Abschnitt 2.2.3) beschrieben [143]. Wie bereits bei anderen Ionen der Hofmeister-Serie (siehe Abschnitt 2.2.3) [35, 39, 40] zeigen neueste Untersuchungen keine Interaktion mit dem Bulkwasser, sondern einen direkten Einfluss von Harnstoff auf Proteine und somit eine direkte Denaturierung [143].

Der Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid auf BSA und β -Lactoglobulin wurde im Hinblick auf die unterschiedlichen Auswirkungen dieser recht ähnlichen Moleküle untersucht. Hinsichtlich des Arginin-Einflusses auf die Harnstoff-Entfaltung bei einer niedrigen Harnstoffkonzentration wurde ein modifiziertes Versuchsschema durchgeführt und die Pufferzusammensetzung variiert. Es wurden dabei drei verschiedene Versuchsserien für das Arginin und das Guanidinhydrochlorid vermessen. Zuerst wurde, wie bei den bereits beschriebenen Interaktionen auch ein Tris-Puffer verwendet, dem zur Detektion der Interaktion 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin beziehungsweise 500 $\mu\text{mol/l}$ Guanidinhydrochlorid zugesetzt wurde. Folglich wurden die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten einmal im reinen Tris-Puffer und einmal unter Ligandenzusatz bestimmt. Die anderen beiden Puffer-Variationen weisen einen Zusatz von 2 mmol/l beziehungsweise 8 mmol/l Harnstoff auf, denen ebenfalls zur Interaktion 500 $\mu\text{mol/l}$ Ligand zugesetzt wurde.

8.1 Interaktionen mit BSA

Die $\Delta R/R_f$ -Werte mit den resultierenden Konfidenzintervallen zeigen eine klare Anordnung nach Arginin- beziehungsweise Guanidinhydrochlorid-Interaktion. Arginin bewirkt eine starke Verringerung der Gesamtmobilität, welche durch den Zusatz von 2 mmol/l Harnstoff abgeschwächt und von 8 mmol/l Harnstoff verstärkt wird. Guanidinhydrochlorid bewirkt entgegengesetzt eine Erhöhung der Mobilität, die durch Erhöhung der Harnstoffkonzentration im BGE zunehmend verringert wird.

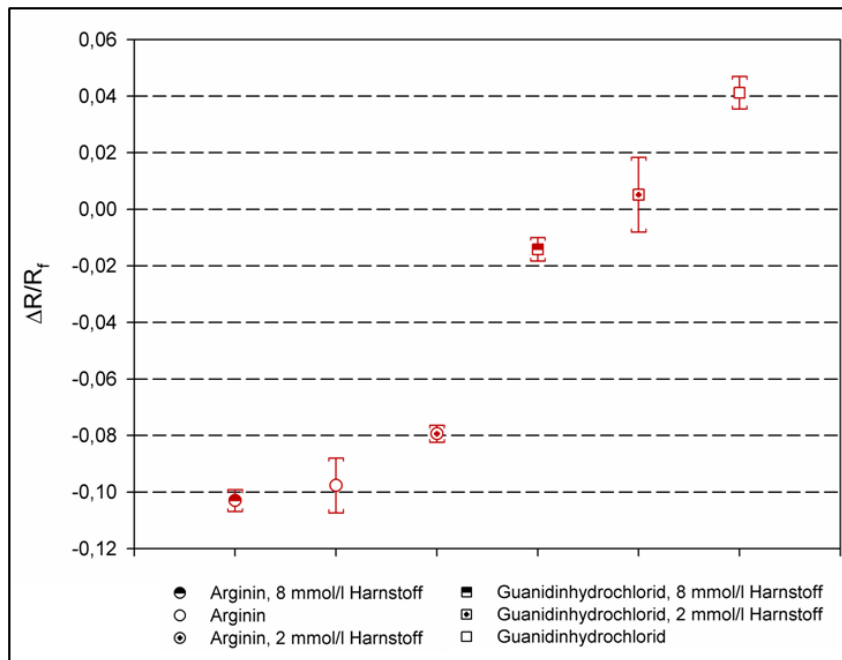


Abbildung 8-1: Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid auf BSA mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im BGE. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin beziehungsweise Guanidinhydrochlorid. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Der Liganden-Einfluss auf die BSA-Peakform zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Arginin im reinen Tris-Puffer verringert die Peakhöhe, wobei 2 mmol/l Harnstoff diese in Gegenwart von Arginin erhöhen und 8 mmol/l Harnstoff diese erniedrigen.

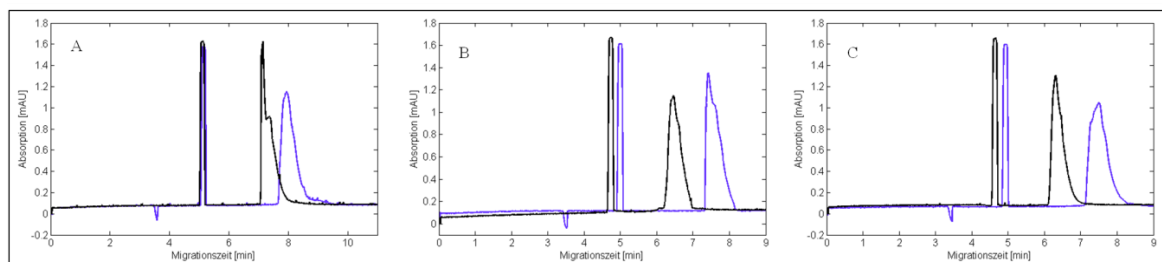


Abbildung 8-2: Elektropherogramme von Acetanilid und BSA. Das schwarze Elektropherogramm wurde ohne Arginin im jeweils verwendeten BGE und das blaue Elektropherogramm mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin im jeweiligen Laufpuffer erhalten.

Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchungen in den drei unterschiedlichen Tris-Puffer-Lösungen:

A: ohne weitere Zusätze

B: mit 2 mmol/l Harnstoff

C: mit 8 mmol/l Harnstoff

Der Guanidinhydrochlorid-Einfluss bewirkt eine schon fast *spike*-förmige Peakerhöhung im Tris-Puffer. Der Einfluss im Tris-Puffer mit 2 mmol/l Harnstoff zeigt keine Veränderung der Form und weist auch keinen signifikanten Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität (Abbildung 8-1) auf, wohingegen 8 mmol/l Harnstoff im Puffer zu einer Minderung der Peakhöhe führen.

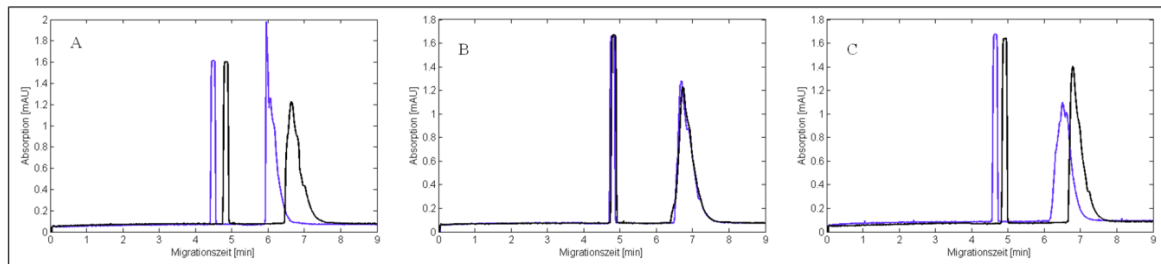


Abbildung 8-3: Elektropherogramme von Acetanilid und BSA. Das schwarze Elektropherogramm wurde ohne Guanidinhydrochlorid im jeweils verwendeten BGE und das blaue Elektropherogramm mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Guanidinhydrochlorid im jeweiligen Laufpuffer erhalten.

Die Teilabteilungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchungen in den drei unterschiedlichen Tris-Puffer-Lösungen:

A: ohne weitere Zusätze

B: mit 2 mmol/l Harnstoff

C: mit 8 mmol/l Harnstoff

8.2 Interaktionen mit β -Lactoglobulin

Die $\Delta R/R_f$ -Werte der Ligandeneinflüsse auf β -Lactoglobulin sind nicht so deutlich nach den Liganden Arginin beziehungsweise Guanidinhydrochlorid angeordnet (siehe Abbildung 8-4). Arginin, Arginin unter Zusatz von 2 mmol/l Harnstoff zum Puffer und Guanidinhydrochlorid haben sogar keine signifikanten Interaktionen. Der Einfluss der Harnstoffkonzentration zeigt eine starke, konzentrationsabhängige Änderung der effektiven elektrophoretischen Mobilität, so dass Guanidinhydrochlorid und 8 mmol/l Harnstoff im Tris-Puffer diese sehr stark verringern, während Arginin und 8 mmol/l Harnstoff einen wesentlich schwächeren Effekt aufweisen. Eine geringere Harnstoffkonzentration bewirkt eine Erhöhung der Mobilität sowohl bei Argininzusatz, wenn auch nicht signifikant, und wiederum stärker beim Guanidinhydrochloridzusatz. Unter Berücksichtigung, dass zwei Arginin-Interaktionen keine Signifikanz aufweisen, lässt sich jedoch mit aller Vorsicht die gleiche Tendenz der Arginin-Interaktion im Bezug auf die Harnstoffkonzentration wie beim BSA feststellen. So erhöht eine geringe Harnstoffkonzentration den $\Delta R/R_f$ -Wert und eine höhere Harnstoffkonzentration von 8 mmol/l verringert diesen.

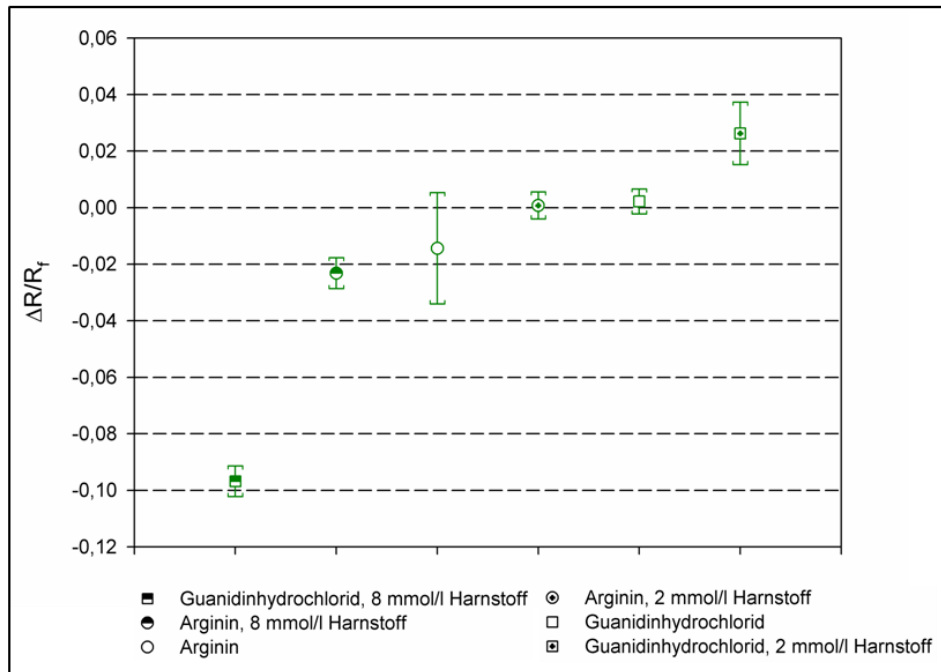


Abbildung 8-4: Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid auf β -LG mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im BGE. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin beziehungsweise Guanidinhydrochlorid. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Die Peakform des β -Lactoglobulins in den Elektropherogrammen wird durch den Argininzusatz stark beeinflusst. Arginin bewirkt die Ausbildung einer Schulter im β -LG-Peak unabhängig von dem Harnstoffzusatz, was auf eine anteilige Konformationsänderung hindeutet.

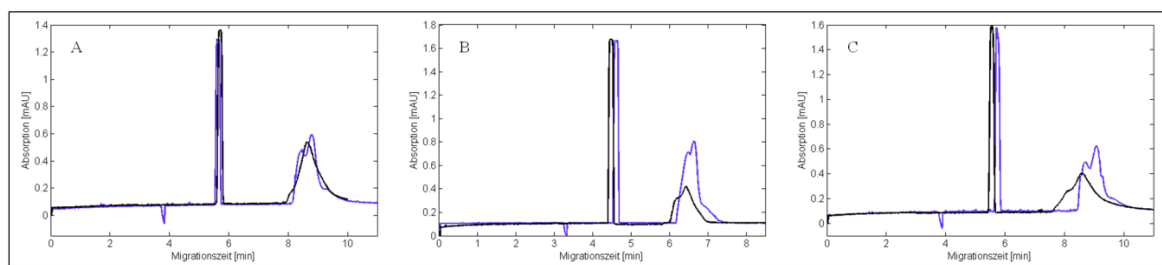


Abbildung 8-5: Elektropherogramme von Acetanilid und β -LG. Das schwarze Elektropherogramm wurde ohne Arginin im jeweils verwendeten BGE und das blaue Elektropherogramm mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin im jeweiligen Laufpuffer erhalten. Die Teilabbildungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchungen in den drei unterschiedlichen Tris-Puffer-Lösungen:
A: ohne weitere Zusätze B: mit 2 mmol/l Harnstoff C: mit 8 mmol/l Harnstoff

Die Peakform-Veränderungen der Guanidinhydrochlorid-Interaktionen sind dagegen nicht durch den Einfluss von Guanidinhydrochlorid allein zu erklären. Erst im Zusammenspiel mit 8 mmol/l Harnstoff zeigt sich eine Verbreiterung des Peaks mit geringerer Peakhöhe.

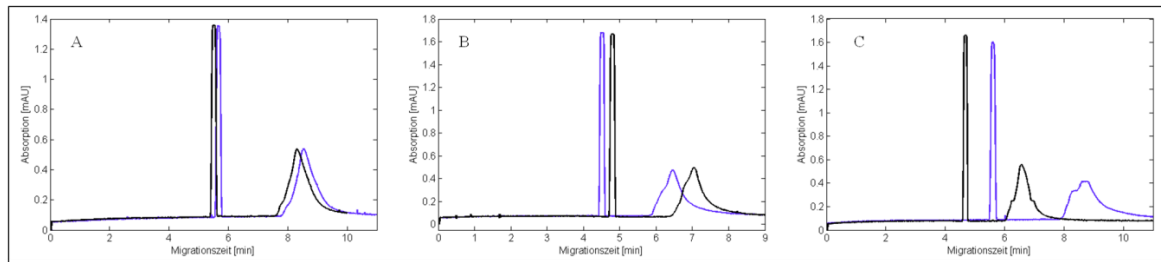


Abbildung 8-6: Elektropherogramme von Acetanilid und β -LG. Das schwarze Elektropherogramm wurde ohne Guanidinhydrochlorid im jeweils verwendeten BGE und das blaue Elektropherogramm mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Guanidinhydrochlorid im jeweiligen Laufpuffer erhalten.

Die Teilabteilungen zeigen die Mobilitätsveränderung der Interaktionsuntersuchungen in den drei unterschiedlichen Tris-Puffer-Lösungen:

A: ohne weitere Zusätze

B: mit 2 mmol/l Harnstoff

C: mit 8 mmol/l Harnstoff

8.3 Präzision der Mobilitätsquotienten

Die Auswertung aller erhaltenen Mobilitätsquotienten R_f und R_i ergab für 88% eine $RSD\%$ unter 1 und für 96% unter 2.

Tabelle 8-1: prozentuale relative Standardabweichung der Mobilitätsquotienten R_f und R_i

Protein	Ligand	$RSD\%$ von den R_f -Werten	$RSD\%$ von den R_i -Werten
BSA	Arginin	0,92	0,60
	Arginin, 2 mmol/l Harnstoff	0,30	0,16
	Arginin, 8 mmol/l Harnstoff	0,23	0,40
	Guanidinhydrochlorid	0,54	0,32
	Guanidinhydrochlorid, 2 mmol/l Harnstoff	1,39	0,41
	Guanidinhydrochlorid, 8 mmol/l Harnstoff	0,36	0,29
β -Lactoglobulin	Arginin	2,17	0,32
	Arginin, 2 mmol/l Harnstoff	0,36	0,38
	Arginin, 8 mmol/l Harnstoff	0,52	0,31
	Guanidinhydrochlorid	0,25	0,41
	Guanidinhydrochlorid, 2 mmol/l Harnstoff	1,06	0,57
	Guanidinhydrochlorid, 8 mmol/l Harnstoff	0,37	0,52

8.4 Zusammenfassung

Der Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration verhält sich unterschiedlich auf die beiden getesteten Proteine. Beim BSA übt die Art des Liganden (Arginin beziehungsweise Guanidinhydrochlorid) einen deutlichen richtungsweisenden Einfluss auf die Änderung der Gesamtmobilität aus. Somit zeigt sich hier, dass Arginin, obwohl es eine Guanidin-Partialstruktur aufweist, als α -Aminocarbonsäure einen deutlich anderen Einfluss auf BSA hat. Folglich bestätigt sich, dass Arginin nicht in die denaturierende Gruppe des Guanidins eingeteilt werden kann. Beim β -Lactoglobulin hingegen scheint die Harnstoffkonzentration einen wesentlich höheren Einfluss auf die Mobilitätsveränderung zu haben als es die Art des getesteten Liganden hat. Demzufolge sind die vorherrschenden Einflüsse stark vom Protein abhängig.

Betrachtet man für jedes Protein die Arginin-Interaktion, zeichnet sich die gleiche Tendenz ab, wenngleich zwei Interaktionen mit β -Lactoglobulin nicht signifikant sind. Der unterschiedliche Arginin-Einfluss auf Proteine in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration scheint sich somit auch auf die Gesamtmobilität auszuwirken.

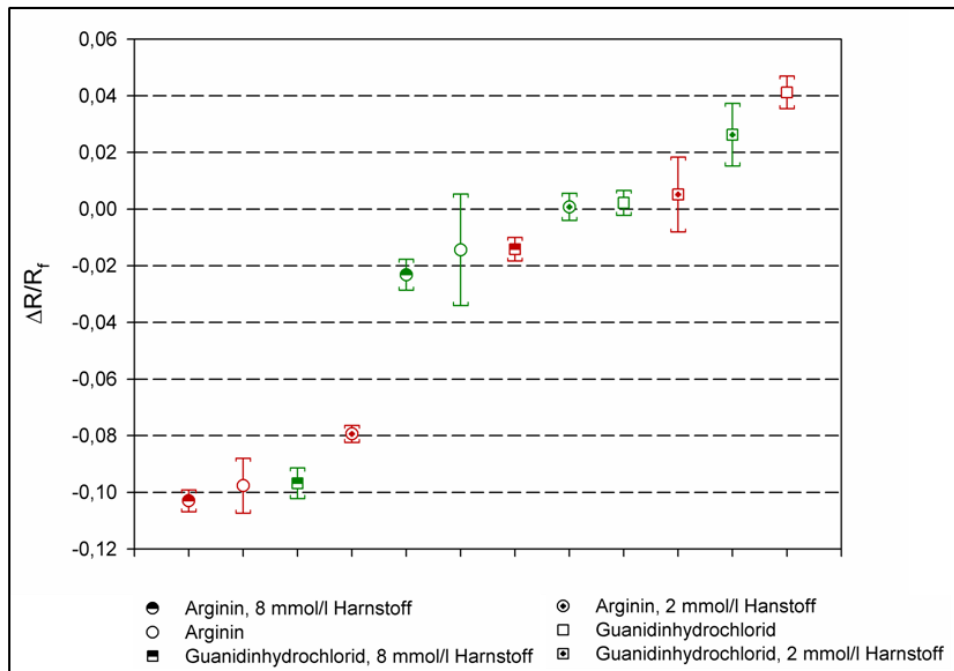


Abbildung 8-7: Einfluss von Arginin und Guanidinhydrochlorid auf BSA (rot) und β -LG (grün) mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im BGE. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_0$ -Werte bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ Arginin beziehungsweise Guanidinhydrochlorid. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_0$ -Werten. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_0$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

9 Einfluss von Phosphorylierungen auf Metallionen-Interaktionen

9.1 Getestete Metallionen

Untersucht wurde der Einfluss der Phosphorylierung eines Peptidsegments von der Isoform 1 der extrazellulär signal-regulierten Kinase (ERK1; siehe Abschnitt 2.4.5) auf Metallionen-Interaktionen. Eingesetzt wurden hierfür die Chloridsalze von Barium, Calcium, Kupfer, Magnesium, Mangan und Nickel. Das untersuchte ERK1-Peptid wurde synthetisch hergestellt und bestand aus 19 Aminosäuren (siehe Tabelle 11-3) inklusive der Aktivierungsschleife des ERK1. Dieses Peptid lag unphosphoryliert und diphosphoryliert an Threonin und Tyrosin vor. Das ERK-Enzym wird durch Doppelphosphorylierung an diesen Aminosäuren (Thr202 und Tyr204) aktiviert und ist an zahlreichen Zellvorgängen beteiligt (siehe Abschnitt 2.4.5). Zudem wurde eine häufige Beteiligung bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen. Hierdurch wächst die Bedeutung, Interaktionen und somit Veränderungen des aktiven und inaktiven Enzyms genauer zu charakterisieren, um weitere Erkenntnisse zur Entstehung aber auch Behandlung dieser Krebsarten zu erlangen.

9.2 Extrazellulär signal-regulierten Kinase 1 - Peptidsegment

9.2.1 Ermittlung der notwendigen Peptidkonzentration

Von den beiden Peptiden wurden nur geringe Mengen synthetisiert, so dass einige Parameter zur Bestimmung der nötigen Konzentration abgeschätzt werden mussten. Der isoelektrische Punkt von 4,84 und das Molekulargewicht für das unphosphorylierte Peptid von 2172,33 Da und für das diphosphorylierte Peptid von 2267,33 Da wurden mit dem *Protein Calculator* v3.3 (www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html) bestimmt. Eine Näherung an den molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{ERK1,214nm}$ für eine Wellenlänge von 214 nm, bei der die Peptidbindungen UV-Licht absorbieren, wurde über eine Formel nach Kuipers et al. [145] für das unphosphorylierte Peptid bestimmt:

$$\epsilon_{Protein/Peptid} = \epsilon_{Peptidbindung} \cdot n_{Peptidbindung} + \sum_{i=1}^{20} \epsilon_{Aminosäure(i)} \cdot n_{Aminosäure(i)} \quad (9-1)$$

In die Formel wurden die in [145] ermittelten Absorptionskoeffizienten für die jeweiligen Aminosäuren und die Peptidbindung eingesetzt, so dass ein molarer Absorptionskoeffizient für das unphosphorylierte ERK1-Peptid $\epsilon_{ERK1,214nm} = 38184 \frac{l}{mol \cdot cm}$ ermittelt wurde.

Tabelle 9-1: molare Absorptionskoeffizienten [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] von Aminosäuren und Peptidbindung nach [145]

Aminosäure / Peptidbindung	Einbuchstabencode	Molarer Absorptionskoeffizient $\epsilon \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$	Anzahl im ERK1-Peptid
Alanin	A	32	2
Arginin	R	102	1
Asparagin	N	136	-
Asparaginsäure	D	58	2
Cystein	C	225	-
Glutamin	Q	142	-
Glutaminsäure	E	78	2
Glycin	G	21	1
Histidin	H	5125	2
Isoleucin	I	45	1
Leucin	L	45	1
Lysin	K	41	-
Methionin	M	980	-
Phenylalanin	F	5200	1
Prolin	P	30	1
Serin	S	34	-
Threonin	T	41	3
Tryptophan	W	29050	-
Tyrosin	Y	5375	1
Valin	V	43	1
Peptidbindung	-	923	18

Der ermittelte molare Absorptionskoeffizient $\epsilon_{\text{ERK1},214\text{nm}}$ wird in ein Verhältnis zum molaren Absorptionskoeffizient $\epsilon_{\text{BSA},214\text{nm}}$ und der BSA-Konzentration c_{BSA} gesetzt, um eine ERK1-Peptid-Konzentration mit vergleichbarer Absorption zu erhalten. Der molare Absorptionskoeffizient $\epsilon_{\text{BSA},214\text{nm}}$ wurde über das Lambert-Beersche Gesetz (siehe Abschnitt 3.1.3) berechnet:

$$\epsilon_{\text{BSA},214\text{ nm}} = \frac{A_{\text{BSA},214\text{ nm}}}{c_{\text{BSA}} \cdot d} \quad (9-2)$$

$$A_{\text{ERK1},214\text{ nm}} = A_{\text{BSA},214\text{ nm}} \quad (9-3)$$

Durch die Gleichsetzung der Absorptionen ergibt sich Formel (9-4):

$$\epsilon_{\text{ERK1},214\text{ nm}} \cdot c_{\text{Erk1}} = \epsilon_{\text{BSA},214\text{ nm}} \cdot c_{\text{BSA}} \quad (9-4)$$

Durch Umformung der Formel (9-4) erhält man eine Konzentration c_{ERK1} von 324,11 $\mu\text{mol/l}$, folglich werden für eine vergleichbare Absorption 0,704 mg/ml von dem unphosphorylierten und 0,735 mg/ml von dem diphosphorylierten Peptid benötigt. Für die Metallionen-Interaktionsversuche konnte aus den vorhandenen Mengen nur jeweils eine Peptidlösung hergestellt und vermessen werden.

9.2.2 Interaktionen mit ERK1-Peptiden

Bedingt durch die geringen Mengen, die von den beiden Peptiden zur Verfügung standen, wurde ein leicht verändertes Versuchsschema durchgeführt. Vor jeder neuen getesteten Interaktions-Versuchsreihe wurden sechs Läufe nur mit Acetanilid als Analyten und purem Laufpuffer vermessen. Dieses sollte einer Überprüfung des Systems, vor allem der Kapillaroberfläche, dienen. Diese eingeschobenen Überprüfungen wiesen eine stabile, reproduzierbare Gesamtmobilität des Acetanilids auf, so dass im Anschluss ein Metallionen-Interaktionsversuch gestartet werden konnte. Die Versuchsreihe bestand dann aus 6 Läufen des entsprechenden ERK1-Peptids mit purem Laufpuffer, anschließend sechs Läufe mit 250 $\mu\text{mol/l}$ des entsprechenden Metallions im Laufpuffer, gefolgt von sechs Läufen mit 500 $\mu\text{mol/l}$ des Metallions im Laufpuffer.

Die Elektropherogramme zeigen auf Grund der nicht komplett aufgereinigten, synthetisierten Peptide einige kleine Nebenpeaks (Abbildung 9-1). Diese nahmen im Verlauf der Versuche, wahrscheinlich durch die Instabilität des Peptids, leicht zu, da für alle Metallionen-Interaktionsversuche dieselbe Lösung vermessen werden musste. Die erhaltene Peakhöhe für das diphosphorylierte Peptid war geringer (Abbildung 9-1).

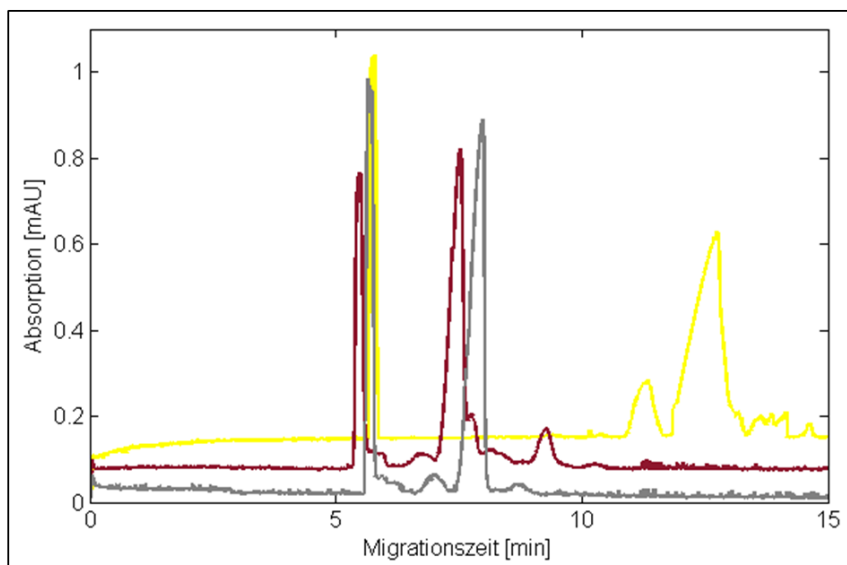


Abbildung 9-1: Elektropherogramme von Acetanilid und den ERK1-Peptiden. Das graue Elektropherogramm zeigt das unphosphorylierte ERK1-Peptid zu Beginn der Versuchsreihe und das bordeauxrote Elektropherogramm gegen Ende. Das gelbe Elektropherogramm zeigt das diphosphorylierte ERK1-Peptid. Alle Elektropherogramme wurden mit Tris als Laufpuffer erhalten.

Das unphosphorylierte ERK1-Peptid hatte unter dem Einfluss von allen getesteten Metallionen eine längere Migrationszeit und folglich eine geringere Gesamtmobilität. Dies weist, wie in Abschnitt 5.2 bereits erläutert, auf eine Zunahme der effektiven Gesamtladung des Peptids hin. Alle erhaltenen $\Delta R/R_f$ -Werte weisen einen negativen Wert auf. Der Einfluss der Metallionen auf das diphosphorylierte ERK1-Peptid ist hingegen nicht so homogen ausgeprägt. Hier zeigt das Peptid unter Barium- und Nickelchlorid-Einfluss eine kürzere Migrationszeit. Die $\Delta R/R_f$ -Werte sind demzufolge für diese beiden Interaktions-Paare positiv. Dementsprechend erscheint die Gesamtladung des Peptids weniger negativ als im puren Laufpuffer. Die Migrationszeit des diphosphorylierten ERK1-Peptids überschritt unter dem Einfluss von 500 $\mu\text{mol/l}$ Manganchlorid deutlich die verwendeten 20 Minuten Detektionszeit. Folglich werden die Werte für 250 $\mu\text{mol/l}$ Manganchlorid im Laufpuffer verglichen.

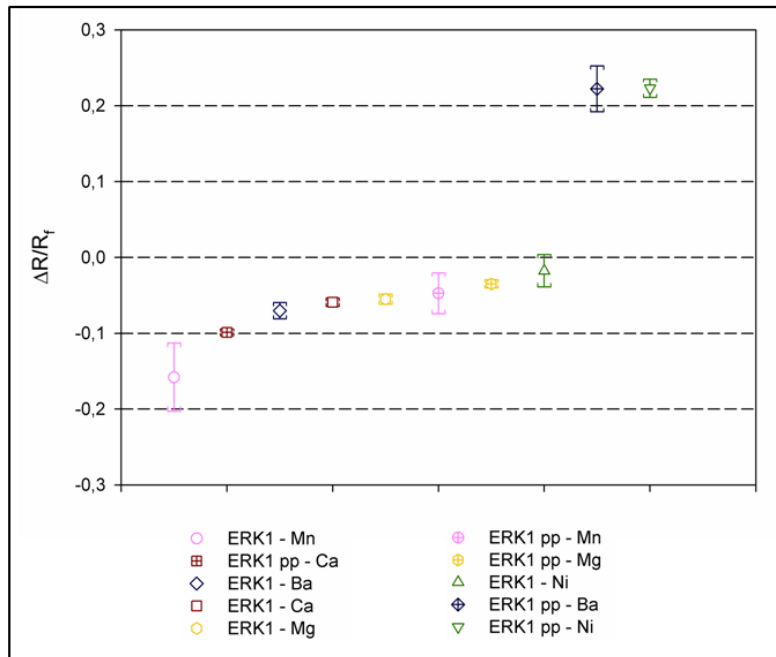


Abbildung 9-2: Metallionen-Einflüsse auf das unphosphorylierte und diphosphorylierte (pp) ERK1-Peptid. Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte bei einer Metallionenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ (Ausnahme Manganchlorid: 250 $\mu\text{mol/l}$).

Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten.

Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Wie aus Abbildung 9-2 ersichtlich wird, zeigen Barium- und Nickelchlorid einen deutlichen Unterschied auf den Einfluss des diphosphorylierten Peptids im Vergleich zum unphosphorylierten. Die Phosphorylierungen zeigen beim Magnesium- und Calciumchlorid-Einfluss keinen großen Unterschied auf die Beeinflussung der Mobilität. Die Gesamtmobilität des unphosphorylierten ERK1-Peptids wird stärker verändert als beim diphosphorylierten. Eine zweite Auffälligkeit zeigt sich bei der Calciumchlorid-Interaktion. Die Calciumchlorid-Interaktionspaare zeigen einen höheren $\Delta R/R_f$ -Betrag beim diphosphorylierten Peptid. Alle anderen Peptid-Interaktionspaare weisen hingegen eine andere Richtung der Mobilitätsbeeinflussung auf.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen somit einen Metallionen-abhängigen Unterschied auf die effektive elektrophoretische Mobilität vom unphosphorylierten und diphosphorylierten Peptid. Der Einfluss des Calciumchlorids als ein an vielen Signalwegen beteiligtes Metall und der des Nickelchlorids, dessen genauer Allergiemechanismus noch nicht geklärt ist, ist hier besonders interessant.

9.2.3 Präzision der Mobilitätsquotienten

Die Präzision der Mobilitätsquotienten R_f und R_i ergeben bei einer Ligandenkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ Barium-, Calcium-, Magnesium- und Nickelchlorid und 250 $\mu\text{mol/l}$ Manganchlorid zu 65% eine $RSD\%$ unter 1 und zu 80% unter 2.

Tabelle 9-2: prozentuale relative Standardabweichung der Mobilitätsquotienten R_f und R_i

Peptid	Ligand	$RSD\%$ von den R_f -Werten	$RSD\%$ von den R_i -Werten
ERK1-Peptid (unphosphoryliert)	Bariumchlorid	0,33	1,22
	Calciumchlorid	0,47	0,42
	Magnesiumchlorid	0,61	0,43
	Manganchlorid	0,53	5,77
	Nickelchlorid	0,39	2,31
ERK1-Peptid (diphosphoryliert)	Bariumchlorid	2,91	1,30
	Calciumchlorid	0,42	0,25
	Magnesiumchlorid	0,45	0,34
	Manganchlorid	1,12	2,87
	Nickelchlorid	0,86	0,73

10 Zusammenfassung

Der Einfluss der untersuchten Metallionen, Arzneistoffe und anionisch vorliegenden Zusätze auf die Proteine ist stark variierend. Die zusammenfassende Darstellung der $\Delta R/R_f$ -Werte (Abbildung 10-1) veranschaulicht die weit gefächerte Auswirkung auf die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten der Proteine. Zur besseren Übersicht sind die negativen $\Delta R/R_f$ -Werte in der linken und die positiven $\Delta R/R_f$ -Werte in der rechten Teilabbildung dargestellt. Auffällig in Abbildung 10-1 ist der Einfluss auf die Myoglobin-Mobilität durch die anionischen Zusätze, die deutlich geringer ist im Vergleich zu den Ligandeneinflüssen auf die anderen Proteine.

Die Auswirkungen der anionischen Zusätze zeigt eine weite Streuung von Verringerung bis starker Erhöhung der Gesamtmobilität der Proteine. Die stärksten Erhöhungen werden dabei durch Interaktionen mit Natriumacetat (Ovalbumin-Isoformen), Dinatriumhydrogenphosphat (BSA, β -LG), Kaliumiodid (β -LG) und Natriumnitrat (Ovalbumin-Isoformen) hervorgerufen. Durch die verschiedenen getesteten Interaktionen im Phosphat- und Tris-Puffer konnte ein großer Einfluss der Phosphationen auf die Mobilität der Proteine gezeigt werden. Somit bekommt die Auswahl des Puffersystems, insbesondere bei der Betrachtung der Mobilitäten, eine besondere Bedeutung bei Untersuchungen von Proteinen.

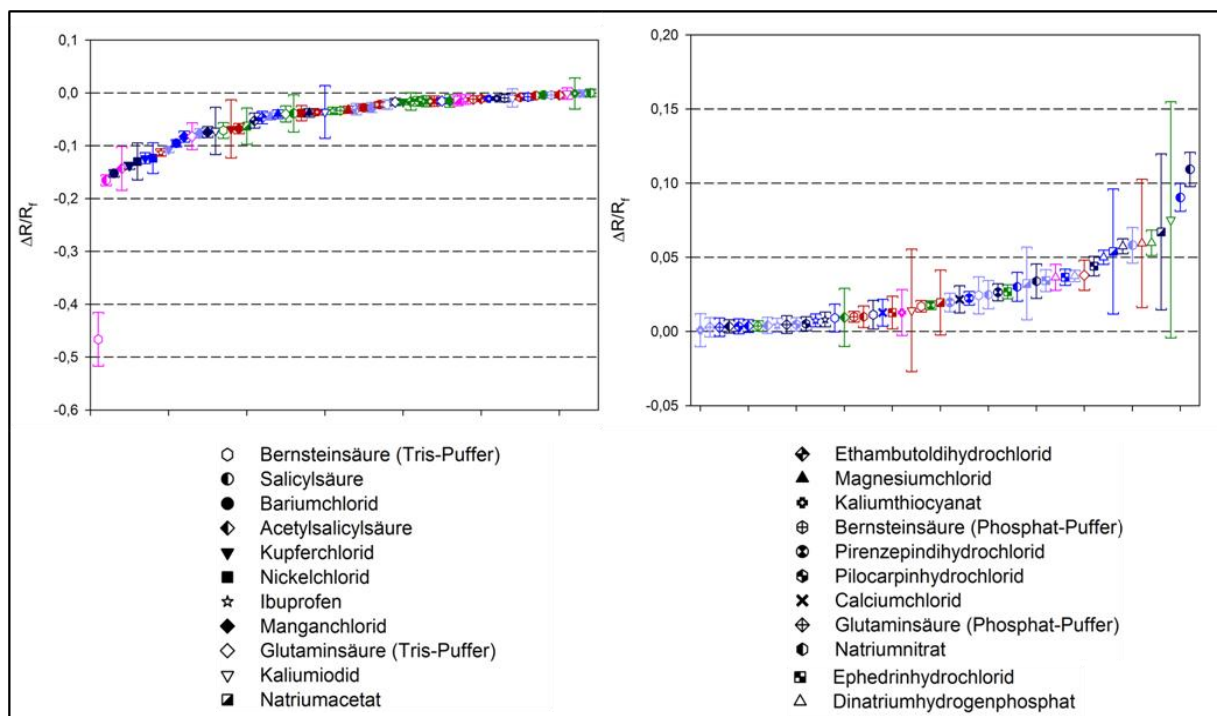


Abbildung 10-1: zusammenfassende Darstellung der Metallionen-, Anionen- und Arzneistoff-Einflüsse auf BSA (rot), β -LG (grün), Myoglobin (magenta) und den Ovalbumin-Isoformen (Zuordnung der Blautöne zu den Isoformen vgl. Abb. 2-8). Dargestellt sind die Konfidenzintervalle der $\Delta R/R_f$ -Werte. Reihenfolge der Interaktions-Paare nach aufsteigenden $\Delta R/R_f$ -Werten; die linke Teilabbildung zeigt die negativen $\Delta R/R_f$ -Werte und die rechte Teilabbildung die positiven $\Delta R/R_f$ -Werte. Bitte beachten: Zum Teil unterschiedliche Maßstäbe der $\Delta R/R_f$ -Achse bei den einzelnen Abbildungen der verschiedenen Liganden-Einflüsse auf die untersuchten Proteine.

Der Einfluss der verschiedenen Metallionen auf die Gesamtmobilität der Proteine führt bei fast allen Interaktions-Paaren zu einer Erniedrigung. Die effektive negativere Gesamtladung der Proteine deutet

auf eine Komplexbildungsreaktion hin. Ein Komplex zwischen dem Protein, dem Metallion und weiteren Anionen aus der umgebenden Lösung ist hierbei sehr wahrscheinlich (siehe Abschnitt 5).

Die Interaktion zwischen den getesteten Proteinen und den kationischen Arzneistoffen zeigen in der zusammenfassenden Abbildung 10-1 keine starken Auffälligkeiten. Die $\Delta R/R_f$ -Werte liegen in einem mittleren Bereich eingerahmt von den Interaktionen mit den Metallionen und anionisch vorliegenden Zusätzen.

Im Gegensatz zu der von der Hofmeister-Serie abgeleiteten Hypothese, bei der für Anionen ein stärkerer Einfluss bezüglich ihrer kosmotropen beziehungsweise chaotropen Eigenschaften beobachtet wird (siehe Abschnitt 2.2.3), lässt sich diese Tendenz bei den durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigen.

Die Peakformen der verschiedenen Proteine wurden unterschiedlich durch die getesteten Liganden beeinflusst. Am auffälligsten hierbei war der Einfluss auf den β -Lactoglobulin-Peak. Dieser wurde besonders stark durch die getesteten Metallionen verändert. Ebenfalls wurde bei der Interaktionstestung mit den anionisch vorliegenden Substanzen eine starke Abflachung des Peaks beobachtet. Dieses trat jedoch unter dem Einfluss der getesteten kationischen Arzneistoffe nicht auf. Möglicherweise üben vor allem kleinere Ionen eine starke Auswirkung auf die Konformation und somit Peakform des β -Lactoglobulins aus.

Der Arginin- beziehungsweise Guanidinhydrochlorid-Einfluss war je nach Protein (BSA oder β -LG) unterschiedlich, obwohl die Liganden chemisch verwandt sind. So wirkt sich die Art des Liganden stärker auf die BSA-Mobilitätsveränderung aus als die Harnstoffkonzentration. Bei β -LG hingegen scheinen die Mobilitätsveränderungen stärker durch die Harnstoffkonzentration beeinflusst worden zu sein.

Der Metallioneneinfluss zeigt in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des ERK1-Peptids deutliche Unterschiede durch Barium-, Nickel- und Manganchlorid. Hierbei wies das diphosphorylierte Peptid jeweils eine deutlich erhöhte Mobilität im Vergleich zum unphosphorylierten auf. Allein beim Calciumchlorid-Einfluss hatte das diphosphorylierte Peptid eine geringere Mobilität als das unphosphorylierte.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zeichnet sich die *Mobility Shift* Affinitätskapillarelektrophorese als eine gute Methode zur Überprüfung von Protein-Liganden-Interaktionen aus. Auf Grund der unerwarteten Verringerungen der effektiven elektrophoretischen Mobilitäten der Proteine durch die Metallionen und einige kationische Arzneistoffe zeigt sich zudem, dass die proteinumgebende Lösung einen bedeutsamen Einfluss auf deren Interaktionen haben muss. So liegt eine Komplexbildung zwischen Protein und Metallion sowie weiteren Anionen aus der umgebenden Lösung nahe. Solche Wechselwirkungen treten wahrscheinlich auch unter physiologischen Bedingungen auf. Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass bei Wechselwirkungen mit kationischen Arzneistoffen einige kleinere mit der Proteinoberfläche in Kontakt stehende Ionen durch die größeren Arzneistoffe verdrängt werden. Interaktionen von Proteinen und Bestandteilen der umgebenden Lösung, wie Puffersubstanzen aber auch Lösungszusätze, können mit der ACE überprüft werden. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Liganden-Einflüsse stark von der individuellen Beziehung des jeweiligen Proteins und des Liganden abhängen. Folglich ist es wichtig auf die Art der Zusätze und deren Konzentration zu Proteinslösungen zu achten und Veränderungen von Proteineigenschaften zu überprüfen. ACE ist dabei

eine gute Methode, um solche Wechselwirkungen bei Anwesenheit von Kofaktoren zu untersuchen. Durch die gute Präzision ist ACE in der Lage selbst geringe Protein-Liganden-Interaktionen zu detektieren. Diese können sogar bei nicht hochgereinigten Proben untersucht werden, wie durch die ERK1-Peptid-Interaktionen gezeigt wurde. So ist ACE eine schnelle und präzise Methode zur Überprüfung von Liganden-Einflüssen auf Proteine, wodurch sie als Screening Methode einsetzbar ist, um weitere Informationen zur Klärung physiologischer und pharmakologischer Eigenschaften von Proteinen zu liefern.

11 Experimenteller Teil

11.1 Instrumentierung und Software

Für die Versuche wurde das Kapillarelektrophoresegerät UniCAM Crystal 310 CE System der Firma UniCAM Ltd. aus Cambridge, Großbritannien, verwendet. Die Steuerung des CE-Gerätes erfolgte über die Crystal CE program V.1.3 Software. Der verwendete UV-Detektor war ein Spectra 100 UV-Detektor der Firma Spectra Physics, Santa Clara, Kalifornien, USA. Alle Elektropherogramme wurden bei einer Wellenlänge von 214 nm aufgezeichnet.

Zur Datenauswertung wurden zuerst die Rohdaten in .ced Dateien mit Hilfe der Software CISS [146] und Matlab® Version R2009b von MathWorks formatiert und anschließend mit CISS integriert. Die darauffolgende Datenauswertung wurde mit Excel® 2007 der Firma Microsoft™ durchgeführt und die grafische Darstellung der Ergebnisse entweder mit SigmaPlot™ Version 10.0 von Systat Software Inc. (Abbildungen 5-3, 5-5, 5-7, 5-9, 6-2, 6-4, 6-6, 6-8, 7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 8-1, 8-4, 8-7, 9-2, 10-1) oder Matlab® (Abbildungen 2-8, 4-6, 5-1, 5-4, 5-6, 5-8, 6-3, 6-5, 6-7, 8-2, 8-3, 8-5, 8-6, 9-1) ausgearbeitet. Die Erstellung der Strukturformeln erfolgte mit Symyx Draw 3.3 der Firma accelrys® (Abbildungen 2-1, 2-2, 6-1). Die schematischen Darstellungen in dieser Arbeit wurden mit Microsoft PowerPoint® 2007 der Firma Microsoft™ erstellt (Abbildungen 2-3, 2-5, 3-1, 3-2, 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 5-2).

11.2 Kapillaren

Die eingesetzten Kapillaren stammten alle von Polymicro Technologies aus Phoenix, Arizona, USA. Es wurden unbeschichtete *bare fused-silica* Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 µm (Polymicro TSP050375) verwendet. Die Kapillaren wurden auf eine totale Kapillarlänge von 62 cm mit einem Glasschneider geschnitten, wobei eine effektive Kapillarlänge von 48 cm vorlag. Die äußere Polyimidbeschichtung der Kapillaren wurde an den Kapillarenden und für das Detektionsfenster abgebrannt. Die auf der äußeren Oberfläche verbleibenden Russpartikel wurden anschließend mit Aceton entfernt.

Die Vorbereitung zur Verwendung einer neuen Kapillare erfolgte durch eine Konditionierung der Kapillaroberfläche mit Natronlauge (1 mol/l) für 40 Minuten bei 1000 mbar und bidestilliertem Wasser für 10 Minuten. Vor jedem Lauf wurde die Kapillare gespült und äquilibriert durch Verwendung von Natronlauge (0,1 mol/l) für 3,5 Minuten bei 2500 mbar, bidestilliertem Wasser für 3,5 Minuten und anschließend ebenfalls bei 2500 mbar mit dem entsprechenden Laufpuffer für 5,5 Minuten.

Um Hintergrundrauschen zu vermeiden, wurde nach 30 aufeinanderfolgenden Läufen eine Spülung für 30 Minuten mit 2500 mbar mit Laufpuffer durchgeführt [106].

11.3 verwendete Methode

Tabelle 11-1: verwendete Methode mit Konditionierung, Trennung (dickere Umrandung) und Spülschritten

	<i>Inlet</i>	<i>Outlet</i>	Druck [mbar]	Zeit [min]	Spannung [kV]
Konditionierung:					
1.	NaOH (1,0 mol/l)	Puffer	1000	40	0
2.	H ₂ O	Puffer	1000	10	0
Analysenbeginn:					
1.	NaOH (0,1 mol/l)	Puffer	2500	3,5	0
2.	H ₂ O	Puffer	2500	3,5	0
3.	Puffer	Puffer	2500	5,5	0
Injektion:					
4.	Probe	Puffer	100	0,15	0
Trennung und Detektion:					
5.	Puffer + evtl. Zusatz	Puffer	0	probenabhängig	20
Spülung nach 30 Läufen:					
1.	Puffer	Puffer	2500	30	0
Analysentag-Ende:					
1.	NaOH (0,1 mol/l)	Puffer	1000	5	0
2.	H ₂ O	Puffer	1000	10	0

11.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 11-2: verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acetanilid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bariumchlorid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Bernsteinsäure	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ephedrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethambutoldihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ibuprofen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Kaliumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumthiocyanat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupferchlorid	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Natriumnitrat	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Nickelchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Manganchlorid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Pilocarpinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pirenzepindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Trizma [®] baze (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

11.4.1 Synthetisches ERK1-Peptid-Paar

Die zwei untersuchten synthetischen ERK1-Peptide wurden von der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturanalyse“ unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf Dieter Lehmann vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg zur Verfügung gestellt. Beide Peptide bestehen aus 19 Aminosäuren und enthalten die Aktivierungsschleife des ERK1-Enzyms. Ein Peptid liegt in der unphosphorylierten und somit inaktiven Form vor, das andere ist diphosphoryliert an Threonin und Tyrosin.

Tabelle 11-3: Aminosäurecode der ERK1-Peptide; p symbolisiert die Phosphorylierung

unphosphoryliertes Peptid	diphosphoryliertes Peptid
I	I
A	A
D	D
P	P
E	E
H	H
D	D
H	H
T	T
G	G
F	F
L	L
T	T-p
E	E
Y	Y-p
V	V
A	A
T	T
R	R

11.5 Lösungen und Puffer

Zur Herstellung der verschiedenen Lösungen wurde immer bidestilliertes Wasser verwendet. Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden durch einen Rotilabo®-Spritzenfilter (CME, 0,22 µm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in die *Vials* gefüllt und anschließend 5 Minuten im Ultraschallbad entgast.

11.5.1 EOF-Marker Lösung

Von dem als EOF-Marker verwendeten Acetanilid wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1500 µg/ml hergestellt. Dazu wurden 37,5 mg Acetanilid in 25,0 ml der verwendeten Pufferlösung gelöst. Von dieser Stammlösung wurde 1,0 ml zu einer Proteinprobenlösung gegeben, die 5,0 ml als Endvolumen beträgt. Somit ergibt sich eine Acetanilid-Konzentration von 300 µg/ml in einer Proteinprobenlösung.

11.5.2 Proteinlösungen

Tabelle 11-4: verwendete Proteine

Protein	Hersteller	Artikelnummer
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A7638
β-Lactoglobulin aus der Kuhmilch	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	L2506
Myoglobin aus dem Pferdeherz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	M1882
Ovalbumin aus dem Hühnerei	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A5503

Für die durchgeführten Versuche wurden Proteinkonzentrationen von 50 µmol/l für β-Lactoglobulin, Myoglobin und Ovalbumin verwendet. Die Konzentration der BSA-Probenlösung war 20 µmol/l. Zu jeder Proteinlösung wurde ein gewisses Volumen der Acetanilid-Stammlösung zugegeben, so dass die Endkonzentration des Acetanilids 300 µg/ml betrug.

11.5.3 Ligandenlösungen

Für die Ligandenlösungen wurde zuerst immer eine Stammlösung von 5 mmol/l hergestellt und anschließend die entsprechenden Verdünnungsreihen. Zu Beginn der Arbeit wurden Verdünnungsreihen von 10 µmol/l, 25 µmol/l, 50 µmol/l, 100 µmol/l, 250 µmol/l und 500 µmol/l hergestellt. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden nur noch zwei verschiedene Verdünnungen verwendet, entweder 100 µmol/l und 250 µmol/l oder 250 µmol/l und 500 µmol/l. Das Lösen des Liganden und die Verdünnung wurden jeweils mit dem verwendeten Laufpuffer durchgeführt.

11.5.4 Phosphatpuffer

Der für einige Versuche verwendete Phosphatpuffer wies einen pH-Wert von 7,4 und eine Konzentration von 12,5 mmol/l auf. Hierzu wurden 2,23 g Dinatriumhydrogenphosphat in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde durch Zugabe einer Kaliumdihydrogenphosphatlösung eingestellt, für die 0,82 g Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen und zu 500,0 ml gelöst wurden.

11.5.5 Tris-Puffer

Für den Tris-Puffer wurden 1,21 g des Tris(hydroxymethyl)aminomethans eingewogen und zu ungefähr 150 ml in bidestilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt und diese Lösung zu 500,0 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, so dass eine Konzentration von 0,02 mol/l vorliegt.

13 Literaturverzeichnis

- [1] LaBaer, J., *Journal of Proteome Research*. 2005, 4 (4), 1053–1059.
- [2] Baker, M., *Nature Biotechnology*. 2005, 23 (3), 297–304.
- [3] Combe, C., Tredree, R. L., Schellekens, H., *Pharmacotherapy*. 2005, 25 (7), 954–962.
- [4] Covic, A., Cannata-Andia, J., Cancarini, G., Coppo, R., Frazao, J. M., Goldsmith, D., Ronco, P., Spasovski, G. B., Stenvinkel, P., Utas, C., Wiecek, A., Zoccali, C., London, G., *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008, 23 (12), 3731–3737.
- [5] Dingermann, T., Zündorf, I., *Pharmazie in Unserer Zeit*. 2012, 41 (6), 446–452.
- [6] Rais, I., *Pharmazie in Unserer Zeit*. 2012, 41 (6), 453–460.
- [7] Kerscher-Hack, S., *Pharmazeutische Zeitung*. 2013, 158 (11), 984–985.
- [8] Wang, W., Nema, S., Teagarden, D., *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 390 (2), 89–99.
- [9] Jiskoot, W., Randolph, T. W., Volkin, D. B., Middaugh, C. R., Schöneich, C., Winter, G., Friess, W., Crommelin, D. J. A., Carpenter, J. F., *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, 101 (3), 946–954.
- [10] Hamada, H., Arakawa, T., Shiraki, K., *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009, 10 (4), 400–407.
- [11] Fielding, L., Rutherford, S., Fletcher, D., *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2005, 43 (6), 463–470.
- [12] Yan, J., Wu, H., Tom, T., Brodsky, O., Maegley, K., *American Journal of Analytical Chemistry*. 2011, 02 (06), 639–649.
- [13] Pidock, E., Moore, G. R., *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2001, 6 (5-6), 479–489.
- [14] Ueda, E., Gout, P., Morganti, L., *Journal of Chromatography A*. 2003, 988 (1), 1–23.
- [15] Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A., Martel, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, 53 (5), 1288–1297.
- [16] Wilcox, D. E., *Inorganica Chimica Acta*. 2008, 361 (4), 857–867.
- [17] McKone, E. F., Shao, J., Frangolias, D. D., Keener, C. L., Shephard, C. A., Farin, F. M., Tonelli, M. R., Pare, P. D., Sandford, A. J., Aitken, M. L., Kavanagh, T. J., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006, 174 (4), 415–419.
- [18] Gersting, S. W., Kemter, K. F., Staudigl, M., Messing, D. D., Danecka, M. K., Lagler, F. B., Sommerhoff, C. P., Roscher, A. A., Muntau, A. C., *The American Journal of Human Genetics*. 2008, 83 (1), 5–17.
- [19] Hirschberg, R., *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010, 5 (5), 748–749.
- [20] Wang, W., Roberts, C. J., *Aggregation of therapeutic proteins*, Wiley, Hoboken, NJ 2010, S. 1ff.
- [21] Viles, J. H., *Coordination Chemistry Reviews*. 2012, 256 (19-20), 2271–2284.
- [22] Roland, P. N., Grootenboer Mignot, S., Bruns, A., Hurtado, M., Palazzo, E., Hayem, G., Dieudé, P., Meyer, O., Martin, S. C., *Arthritis Research & Therapy*. 2008, 10 (6), R142.

- [23] Schweiker, K. L., Makhatadze, G. I., *Methods in Molecular Biology*. 2009, 490, 261–283.
- [24] Bannwarth, H., Kremer, B., P., Schulz, A., *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2007, S. 315-336.
- [25] Walsh, C., *Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory*, Roberts and Co. Publishers, Englewood, Colo 2006.
- [26] Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2008.
- [27] Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., Jameson, G. B., *Biochemistry*. 1998, 37 (40), 14014–14023.
- [28] Reinders, J., Sickmann, A., *Biomolecular Engineering*. 2007, 24 (2), 169–177.
- [29] Zölls, S., Tantipolphan, R., Wiggernhorn, M., Winter, G., Jiskoot, W., Friess, W., Hawe, A., *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, 101 (3), 914–935.
- [30] Xia, Y., Park, Y.-D., Mu, H., Zhou, H.-M., Wang, X.-Y., Meng, F.-G., *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007, 40 (5), 437–443.
- [31] Schüle, S., Schulz-Fademrecht, T., Garidel, P., Bechtold-Peters, K., Frieß, W., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, 69 (3), 793–807.
- [32] Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Kurganov, B. I., *Biochemistry*. 2005, 70 (9), 1020–1026.
- [33] Singh, L. R., Dar, T. A., Rahman, S., Jamal, S., Ahmad, F., *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2009, 1794 (6), 929–935.
- [34] Paschek, D., Ludwig, R., *Angewandte Chemie*. 2011, 123 (2), 368–370.
- [35] Zhang, Y., Cremer, P. S., *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, 10 (6), 658–663.
- [36] Chen, X., Weber, I., Harrison, R. W., *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, 112 (38), 12073–12080.
- [37] Richter, G., *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.] 2003, S. 200.
- [38] Parsons, D. F., Boström, M., Lo Nostro, P., Ninham, B. W., *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011, 13 (27), 12352.
- [39] Falconer, R. J., Markelz, A. G., *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*. 2012, 33 (10), 973–988.
- [40] Ebbinghaus, S., Kim, S. J., Heyden, M., Yu, X., Heugen, U., Gruebele, M., Leitner, D. M., Havenith, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104 (52), 20749–20752.
- [41] Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J., *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, 44 (45), 7342–7372.
- [42] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 15.
- [43] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 203.
- [44] Kun, R., Szekeres, M., Dékány, I., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009, 96 (3), 1009–1017.

- [45] Mo, H., Tay, K. G., Ng, H. Y., *Journal of Membrane Science*. 2008, 315 (1-2), 28–35.
- [46] Ran, D., Wang, Y., Jia, X., Nie, C., *Analytica Chimica Acta*. 2012, 723, 45–53.
- [47] Chuderland, D., Seger, R., *Molecular Biotechnology*. 2005, 29 (1), 57–74.
- [48] Schaller, J., *Human blood plasma proteins: Structure and function*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ 2008, S. 52.
- [49] Barbosa, L. R., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Bernstorff, S., Itri, R., *Biophysical Journal*. 2010, 98 (1), 147–157.
- [50] Harford, C., Sarkar, B., *Accounts of Chemical Research*. 1997, 30 (3), 123–130.
- [51] Duff, J. R., Kumar, C. V., *Metallomics*. 2009, 1 (6), 518.
- [52] Sokołowska, M., Wszelaka-Rylik, M., Poznański, J., Bal, W., *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009, 103 (7), 1005–1013.
- [53] Böhme, U., Scheler, U., *Chemical Physics Letters*. 2007, 435 (4-6), 342–345.
- [54] Reyes, L., Bert, J., Fornazero, J., Cohen, R., Heinrich, L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2002, 25 (2), 99–108.
- [55] Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., Kruif, K. G. de, *Biopolymers*. 1999, 49 (1), 11–20.
- [56] Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., *Journal of Molecular Biology*. 2002, 318 (4), 1043–1055.
- [57] Tanford, C., Bunville, L. G., Nozaki, Y., *Journal of the American Chemical Society*. 1959, 81 (15), 4032–4036.
- [58] Taulier, N., Chalikian, T. V., *Journal of Molecular Biology*. 2001, 314 (4), 873–889.
- [59] Aymard, P., Durand, D., Nicolai, T., *International Journal of Biological Macromolecules*. 1996, 19 (3), 213–221.
- [60] Evans, S. V., Brayer, G. D., *The Journal of Biological Chemistry*. 1988, 263 (9), 4263–4268.
- [61] Nesbitt, C. A., Yeung, K. K.-C., *The Analyst*. 2008, 134 (1), 65.
- [62] Ordway, G. A., Garry, D. J., *Journal of Experimental Biology*. 2004, 207 (20), 3441–3446.
- [63] Berg, J. M., Häcker, B., Stryer, L., Tymoczko, J. L., *Biochemie*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2010.
- [64] Watson, H. C., *Progress in Stereochemistry*, Butterworth & Co., London 1969, S. 299.
- [65] Huntington, J. A., Stein, P. E., *Journal of Chromatography B*. 2001, 756 (1-2), 189–198.
- [66] Avramescu, M.-E., Borneman, Z., Wessling, M., *Journal of Membrane Science*. 2008, 322 (2), 306–313.
- [67] Stein, P. E., Leslie, A. G. W., Finch, J. T., Turnell, W. G., McLaughlin, P. J., Carrell, R. W., *Nature*. 1990, 347 (6288), 99–102.
- [68] Hunzinger, C., Schrattenholz, A., Poznanović, S., Schwall, G. P., Stegmann, W., *Journal of Chromatography A*. 2006, 1123 (2), 170–181.
- [69] Weijers, M., Hoog, E. H. de, Cohen Stuart, M. A., Visschers, R. W., Barneveld, P. A., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2005, 270-271, 301–308.

- [70] Harrington, H. A., Komorowski, M., Díaz, M. B., Ratto, G. M., Stumpf, M. P. H., *arXiv.org, e-Print Archive, Quantitative Biology*. 2011 (arXiv:1110.3742v1 [q-bio.CB]), 1–20.
- [71] Kinoshita, T., Yoshida, I., Nakae, S., Okita, K., Gouda, M., Matsubara, M., Yokota, K., Ishiguro, H., Tada, T., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, 377 (4), 1123–1127.
- [72] Crews, C. M., Alessandrini, A., Erikson, R. L., *Cell growth & differentiation the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1992, 3 (2), 135–142.
- [73] Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D., Cobb, M. H., *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268 (7), 5097–5106.
- [74] Rubinfeld, H., Seger, R., *Molecular Biotechnology*. 2005, 31 (2), 151–174.
- [75] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 3ff.
- [76] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 283ff.
- [77] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 158ff.
- [78] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S.287f.
- [79] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 288ff.
- [80] Patrinos, G. P., Ansorge, W., *Molecular diagnostics*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston 2005.
- [81] Michov, B., *Elektrophorese: Theorie und Praxis*, W. de Gruyter, Berlin, New York 1996.
- [82] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 276.
- [83] Landers, J. P., *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton 1997, S. 7ff.
- [84] Kühn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., *Capillary electrophoresis: Principles and practice*, Springer op. 1993, S. 10ff.
- [85] Kühn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., *Capillary electrophoresis: Principles and practice*, Springer op. 1993, S. 103ff.
- [86] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 104ff.
- [87] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 280.
- [88] Landers, J. P., *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton 1997, S. 17ff.
- [89] Kühn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., *Capillary electrophoresis: Principles and practice*, Springer op. 1993, S. 152ff.
- [90] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 273.

- [91] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 51ff.
- [92] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 7ff.
- [93] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994.
- [94] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 274ff.
- [95] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten ; mit 34 Tabellen*, Vieweg, Braunschweig [u.a.] 1994, S. 11ff.
- [96] Hage, D. S., Tweed, S. A., *Journal of Chromatography B*. 1997, 699 (1-2), 499–525.
- [97] Tanner, R. E., Herpigny, B., Chen, S.-H., Rha, C. K., *The Journal of Chemical Physics*. 1982, 76 (8), 3866–3872.
- [98] Busch, M. H. A., Carels, L. B., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., *Journal of Chromatography A*. 1997, 777 (2), 311–328.
- [99] Dvořák, M., Svobodová, J., Beneš, M., Gaš, B., *Electrophoresis*. 2013, 34 (5), 761–767.
- [100] Chu, Y.-H., Avila, L. Z., Gao, J., Whitesides, G. M., *Accounts of Chemical Research*. 1995, 28 (11), 461–468.
- [101] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006, S. 281ff.
- [102] Kraak, J. C., Busch, S., Poppe, H., *Journal of Chromatography A*. 1992, 608 (1-2), 257–264.
- [103] Østergaard, J., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis*. 2003, 24 (17), 2903–2913.
- [104] Gebauer, P., Boček, P., *Journal of Chromatography A*. 1997, 772 (1), 73–79.
- [105] Busch, M. H. A., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., *Journal of Chromatography A*. 1997, 775 (1-2), 313–326.
- [106] El-Hady, D., Kühne, S., El-Maali, N., Wätzig, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, 52 (2), 232–241.
- [107] Landers, J. P., *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton 1997, S. 591ff.
- [108] Bose, S., Yang, J., Hage, D. S., *Journal of Chromatography B*. 1997, 697 (1-2), 77–88.
- [109] Heegaard, N. H., Schou, C., Østergaard, J., *Methods in Molecular Biology*, 421, 303–338.
- [110] Chen, Z., Weber, S. G., *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, 27 (9), 738–748.
- [111] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Journal of Chromatography A*. 1996, 721 (1), 173–186.
- [112] Rehm, H., Letzel, T., *Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer, Heidelberg 2010, S. 55ff.
- [113] Bowser, M. T., Sternberg, E. D., Chen, D. D. Y., *Electrophoresis*. 1997, 18 (1), 82–91.
- [114] Tanaka, Y., Terabe, S., *Journal of Chromatography B*. 2002, 768 (1), 81–92.

- [115] Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H., *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*, Oldenbourg, München ; Wien 2005, S. 129ff.
- [116] Wappis, J., Jung, B., *Taschenbuch Null-Fehler-Management: Umsetzung von Six Sigma*, Hanser, München, Wien 2008, S. 72ff, S. 202.
- [117] International Conference on Harmonisation, ICH guideline *Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.
- [118] Praefcke, G. J. K., Herrmann, C., *BIOspektrum*. 2005, 11 (1), 44–46.
- [119] Binder, H. H., *Lexikon der chemischen Elemente: Das Periodensystem in Fakten, Zahlen und Daten*, S. Hirzel, Stuttgart 1999.
- [120] Carvalho, M., Magalhães, T., Becker, M., Bohlen, A. von, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007, 62 (9), 1004–1011.
- [121] Leal, S. S., Botelho, H. M., Gomes, C. M., *Coordination Chemistry Reviews*. 2012, 256 (19–20), 2253–2270.
- [122] Nijhawan, R. I., Molenda, M., Zirwas, M. J., Jacob, S. E., *Dermatologic Clinics*. 2009, 27 (3), 355–364.
- [123] Watanabe, M., Ishimaru, N., Ashrin, M. N., Arakaki, R., Yamada, A., Ichikawa, T., Hayashi, Y., Zimmer, J., *PLoS ONE*. 2011, 6 (4), e19017.
- [124] Steinhilber, D., Roth, H. J., *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe ; 157 Tabellen*, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart 2005, S. 418.
- [125] Steinhilber, D., Roth, H. J., Schubert-Zsilavecz, M., *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe ; 157 Tabellen*, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart 2005, S. 478.
- [126] Steinhilber, D., Roth, H. J., Schubert-Zsilavecz, M., *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe ; 157 Tabellen*, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart 2005, S. 340.
- [127] Gaberc-Porekar, V., Menart, V., *Chemical Engineering & Technology*. 2005, 25 (11), 1306–1314.
- [128] Dokmanić, I., Šikić, M., Tomić, S., *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2008, 64 (3), 257–263.
- [129] Shirran, S. L., Barran, P. E., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009, 20 (6), 1159–1171.
- [130] Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P. J., Tucker, A., *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1998, 70 (1), 33–39.
- [131] Arias-Moreno, X., Abian, O., Vega, S., Sancho, J., Velazquez-Campoy, A., *Current Protein & Peptide Science*. 2011, 12 (4), 325–338.
- [132] Loch, J., Polit, A., Górecki, A., Bonarek, P., Kurpiewska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., Lewiński, K., *Journal of Molecular Recognition*. 2011, 24 (2), 341–349.
- [133] Dudev, T., Lim, C., *Journal of the American Chemical Society*. 2002, 124 (23), 6759–6766.
- [134] Blaske, F., Dissertationsschrift in Vorbereitung, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Uwe Karst, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster.

- [135] Navarra, G., Leone, M., Militello, V., *Biophysical Chemistry*. 2007, 131 (1-3), 52–61.
- [136] Dai, H. J., Krull, I. S., *Journal of Chromatography A*. 1998, 807 (1), 121–128.
- [137] Brechtel, R., Hohmann, W., Rüdiger, H., Wätzig, H., *Journal of Chromatography A*. 1995, 716 (1-2), 97–105.
- [138] Pipich, V., Balz, M., Wolf, S. E., Tremel, W., Schwahn, D., *Journal of the American Chemical Society*. 2008, 130 (21), 6879–6892.
- [139] Parca, L., Gherardini, P. F., Helmer-Citterich, M., Ausiello, G., *Nucleic Acids Research*. 2011, 39 (4), 1231–1242.
- [140] Hirsch, A. K. H., Fischer, F. R., Diederich, F., *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, 46 (3), 338–352.
- [141] Bracher, F., *Arbeitsbuch quantitative anorganische Analyse für Pharmazie- und Chemiestudenten*, Govi-Verl., Eschborn Taunus 2003, S. 88.
- [142] Ghosh, R., Sharma, S., Chattopadhyay, K., *Biochemistry*. 2009, 48 (5), 1135–1143.
- [143] Funkner, S., Havenith, M., Schwaab, G., *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, 116 (45), 13374–13380.
- [144] Itri, R., Caetano, W., Barbosa, L. R. S., Baptista, M. S., *Brazilian Journal of Physics*. 2004, 34 (1), 58–63.
- [145] Kuipers, B. J. H., Gruppen, H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55 (14), 5445–5451.
- [146] Schirm, B., Wätzig, H., *Chromatographia*. 1998, 48 (5-6), 331–346.

